



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/54, 1/19, C12P 33/00, C12N 9/10</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/40203</b>
		(43) Date de publication internationale: 12 août 1999 (12.08.99)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00237

(22) Date de dépôt international: 4 février 1999 (04.02.99)

(30) Données relatives à la priorité:  
98/01329 5 février 1998 (05.02.98) FR

(71) Déposant: HOECHST MARION ROUSSEL [FR/FR]; 1, terrasse Bellini, F-92800 Puteaux (FR).

(72) Inventeurs: ACHSTETTER, Tilman; Uhlandweg 11, D-77704 Oberkirch (DE). CAUET, Gilles; 8, rue du Maréchal Leclerc, F-67370 Griesheim/Souffel (FR). DEGRYSE, Eric; 4, rue des Alisiers, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean, Claude; Hoechst Marion Roussel, 102, route de Noisy, F-93235 Romainville Cedex (FR).

(81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, CZ, HR, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, PL, SI, SK, TR, UA, YU, brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

**Publiée***Avec rapport de recherche internationale.*

(54) Title: YEAST STRAINS WITH INTERRUPTED ATF2 GENE AND USES

(54) Titre: SOUCHES DE LEVURE AYANT LE GENE ATF2 INTERROMPU ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a modified yeast strain wherein the acetyl-CoA pregnenolone acetyl-transferase activity (APAT) is eliminated by alteration of the gene coding for said activity and which results in stabilisation of the 3 $\beta$ -hydroxysteroids.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet une souche de levure modifiée dans laquelle l'activité acétyl-CoA prégnénolone acétyl-transférase (APAT) est éliminée par altération du gène codant pour cette activité et dont il résulte une stabilisation des 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes.

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Souches de levure ayant le gène ATF2 interrompu  
et leurs applications.**

La formation de 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïdes à partir de précurseurs 3β-hydroxy-delta<sup>5</sup> dans la biosynthèse de toutes  
5 les classes d'hormones stéroïdes chez les mammifères est catalysée par le système enzymatique 3β-hydroxy-delta<sup>5</sup>-stéroïde déshydrogénase (EC 1.1.1.145) et delta<sup>5</sup>-delta<sup>4</sup>-stéroïde isomérase (EC 5.3.3.1), dénommé 3β-HSD. La 3β-HSD catalyse par exemple la transformation de la prégnénolone en  
10 progestérone, de la 17α-hydroxyprégnénolone en 17α-hydroxy-progestérone, de la déhydroépiandrosterone en delta<sup>4</sup>-androstènedione ou du 5-androstène-3β-17β-diol en testostérone (Simard et al., 1996).

La 3β-HSD représente donc l'une des enzymes-clé de la  
15 voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol dans le cortex adrénalien des mammifères (Figure 1).

L'utilisation de microorganismes recombinants, en particulier de levures transformées permettant l'expression hétérologue de l'un ou plusieurs des enzymes de mammifères de  
20 cette voie de biosynthèse pour produire de l'hydrocortisone ou des intermédiaires de cette biosynthèse a été décrite par exemple dans la demande de brevet européenne EP 340878, le brevet US 5,137,822, Dumas et al., 1994 et Cauet et al., 1994.

25 Lorsque la 3β-HSD fonctionnelle est exprimée dans la levure, les cellules de levure transformées ne convertissent pas complètement les 3β-hydroxystéroïdes en 3-oxostéroïdes correspondants, par exemple la prégnénolone en progestérone, mais accumulent un composé observé également dans le cas des  
30 cellules de la levure non transformée. L'identification du composé accumulé à l'ester 3β-acétique du stéroïde de départ et la caractérisation de l'enzyme ayant une activité acyl-transférase responsable de cette estérification (dénommée plus loin APAT pour "acétyl-coenzyme A prégnénolone acétyl-  
35 transférase") sont décrits dans la présente demande. D'autre part, l'accumulation d'acétate de prégnénolone par une souche de levure transformée productrice de prégnénolone a été décrite dans la demande de brevet européenne EP 727489. Ces

observations permettent de considérer que l'estérification des  $3\beta$ -hydroxystéroïdes produite par la levure est indésirable puisqu'elle est responsable de réactions secondaires et de sous-produits conduisant à une diminution du rendement en  $3\beta$ -hydroxystéroïdes accumulés, par exemple en prégnénolone ou à une diminution du rendement de bioconversion de  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -stéroïdes en 3-oxo- $\Delta^4$ -stéroïdes, notamment dans la production de la progestérone ou de la  $17\alpha$ -hydroxy-progestérone conduisant à une diminution de production ultérieure de l'hydrocortisone par la voie de biosynthèse déjà citée.

A la suite des résultats obtenus mentionnés ci-dessus, la présente invention décrit la construction de souches de levure, ayant perdu l'activité APAT indésirable, par altération du gène codant pour cette activité et dont il résulte une stabilisation des  $3\beta$ -hydroxystéroïdes en présence de celles-ci. Ces souches sont donc utilisables comme souches de départ pour construire des souches recombinantes capables de transformer des  $3\beta$ -hydroxystéroïdes en produits ultérieurs avec des rendements améliorés.

L'invention décrit aussi la construction de souches de levure ayant perdu l'activité APAT par altération du gène codant pour cette activité et soit exprimant la  $3\beta$ -HSD ou le cytochrome  $P_{450}17\alpha$ , soit coexprimant la  $3\beta$ -HSD et le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  de la voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol. Les souches exprimant par exemple la  $3\beta$ -HSD permettent d'améliorer les rendements de bioconversion des  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -stéroïdes en 3-oxo- $\Delta^4$ -stéroïdes et sont donc utilisables dans les procédés de production améliorée de l'hydrocortisone ou de ses intermédiaires dans la levure.

La présente invention a donc pour objet une souche de levure modifiée dans laquelle l'activité acétyl-CoA prégnénolone acétyltransférase (APAT) est éliminée par altération du gène codant pour cette activité et dont il résulte une stabilisation des  $3\beta$ -hydroxystéroïdes.

L'altération du gène codant pour l'activité APAT peut être réalisée par exemple par insertion, délétion ou substi-

tution d'une séquence d'ADN dans les éléments fonctionnels du gène, par exemple le promoteur ou la séquence codante pour la protéine ayant l'activité APAT. L'intégration de la séquence d'ADN ainsi altérée dans une souche hôte de levure peut être  
5 ensuite effectuée par exemple par la méthodologie de la recombinaison homologue et conduit à la génération de mutants chromosomiques de levure correspondant aux souches modifiées de l'invention dans lesquelles la disparition de l'activité APAT et la stabilisation des 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes sont mises  
10 en évidence, par exemple par culture des cellules en présence de prégénolone et par mesure de la teneur en prégénolone en fonction du temps en suivant des conditions opératoires décrites plus loin dans la partie expérimentale.

Comme souches de levure hôtes utilisées pour l'inven-  
15 tion, on peut citer notamment les souches de *Saccharomyces* telles que *S. cerevisiae*, les souches de *Candida* telles que *C. maltosa*, les souches de *Kluyveromyces* telles que *K. lactis* ou les souches de *Pichia* telles que *P. pastoris*.

L'invention a particulièrement pour objet une souche de  
20 levure modifiée ci-dessus dans laquelle le gène altéré est le gène ATF2 de *S. cerevisiae* ou un homologue de celui-ci.

Par gène ATF2, on entend le gène de *S. cerevisiae* identifié dans le génome de la levure sous le locus ATF2 ou YGR177c, de "*Saccharomyces* Genome Database" (SGD) ; (Cherry  
25 et al. <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) dont le cadre de lecture ouvert (ORF) dénommé YGR177c est traduit en séquence d'acides aminés dans la banque de données Mips, accessible sous le numéro d'accèsion S64491 (Hebling U., Hofmann B. et Delius H. (May 1996)) et dont la séquence est  
30 montrée à la figure 4. Ce gène code pour une protéine ayant l'activité APAT, comme cela est montré plus loin dans la partie expérimentale.

Par gène homologue du gène ATF2, on entend un gène qui code pour une protéine ayant l'activité APAT et ayant une  
35 identité de séquence d'environ 60 % et plus avec la séquence de la protéine YGR177C.

L'invention a plus particulièrement pour objet une souche de levure modifiée ci-dessus dans laquelle le gène

altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae* et dénommée plus loin souche mutante *atf2*.

L'invention a spécialement pour objet une souche de levure modifiée ci-dessus, dans laquelle le gène *ATF2* est  
5 altéré par insertion d'une séquence d'ADN ayant au moins un nucléotide.

La séquence d'ADN qui est insérée dans le gène *ATF2* de façon à perdre toute activité APAT peut être, par exemple un gène de sélection auxotrophe complétant une exigence nutri-  
10 tionnelle de la souche hôte telle que le gène *URA3*, le gène *LEU2*, le gène *TRP1*, le gène *HIS3* ou le gène *ADE2*, par exemple un gène de sélection dominant tel qu'un gène de résistance à un antibiotique tel que G418, la phléomycine ou l'hygromycine B ou par exemple un gène rapporteur tel que le gène  *$\beta$ GAL*.

15 La séquence d'ADN qui est insérée dans le gène *ATF2* peut être aussi un bloc d'expression de levure constitué d'un promoteur et d'un terminateur de transcription, par exemple un promoteur de levure tel que *PGK*, *TDH3*, *CYC1* ou *TEF1*, par exemple un terminateur de levure tel que *CYC1*, *TDH3*, *TEF1* ou  
20 *PGK*. Le bloc d'expression peut être une combinaison des éléments cités ci-dessus, par exemple le bloc *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*.

L'invention a plus spécialement pour objet une souche de levure modifiée ci-dessus, dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène de sélection *URA3* ou du bloc  
25 d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*.

L'invention a particulièrement pour objet une souche de levure modifiée ci-dessus, dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène de sélection *URA3*.

Les souches mutantes *atf2* de l'invention, dépourvues  
30 d'activité APAT et dans lesquelles le gène *URA3* a été inséré, dénommées plus loin *atf2-Δ::URA3*, ont ainsi pu être sélectionnées par prototrophie à l'uracile.

L'invention a tout spécialement pour objet les souches de *S. cerevisiae* modifiées dénommées TGY156 et TGY158, dont  
35 les constructions détaillées sont données plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi particulièrement pour objet une souche de levure modifiée ci-dessus, dans laquelle le gène

ATF2 est altéré par insertion du bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*. Les souches mutantes *atf2* de l'invention, dépourvues d'activité APAT et dans lesquelles le bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* a été inséré, dénommées plus loin *atf2-Δ::TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*, ont pu être sélectionnées pour l'absence d'un gène *URA3* fonctionnel, remplacé par un bloc d'expression, par leur résistance à l'acide 5-fluoro-orotique (5-FO).

L'invention a tout spécialement pour objet la souche de *S. cerevisiae* modifiée, dénommée TGY186, dont la construction détaillée est donnée plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi pour objet une souche de levure transformée dans laquelle l'activité acétyl-CoA prégnénolone acétyltransférase (APAT) est éliminée par altération du gène codant pour cette activité et exprimant au moins l'une des enzymes de mammifères de la voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol choisie parmi :

- l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*P<sub>450</sub>SCC*),
- la 3β-hydroxy-delta<sup>5</sup>-stéroïde déshydrogénase/delta<sup>5</sup>-delta<sup>4</sup>-stéroïde isomérase (3β-HSD) et
- la 17α-stéroïde hydroxylase (*P<sub>450</sub>17α*).

Les souches de levure transformées de l'invention peuvent être obtenues par exemple par transformation de souches mutantes *atf2* de l'invention selon les méthodes connues, par exemple par transformation par un vecteur d'expression de *P<sub>450</sub>SCC* ainsi que d'ADX et d'ADR, par un vecteur d'expression de la 3β-HSD ou par un vecteur d'expression de *P<sub>450</sub>17α*. Les souches mutantes *atf2* peuvent aussi être éventuellement co-transformées, par exemple par un vecteur d'expression de la 3β-HSD et par un vecteur d'expression de *P<sub>450</sub>17α* ou être transformées par un vecteur de coexpression de la 3β-HSD et de *P<sub>450</sub>17α* et être utilisées par exemple dans un procédé de bioconversion de la prégnénolone en 17α-hydroxyprogestérone.

Des vecteurs construits pour l'expression de *P<sub>450</sub>SCC* ainsi que d'ADX et d'ADR, de la 3β-HSD ou de *P<sub>450</sub>17α* d'origine bovine ou humaine dans des souches de levure ont été décrits, par exemple par Dumas et al., 1994, dans la demande de brevet

européenne EP 340878 ou dans le brevet US 5,137,822.

L'invention concerne particulièrement une souche de levure transformée ci-dessus, dans laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae* ou un homologue de celui-ci. L'invention a plus particulièrement pour objet une souche de levure transformée ci-dessus, dans laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae* et correspondant à une souche *atf2* transformée.

L'invention a tout particulièrement pour objet une souche de levure transformée ci-dessus, dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion d'une séquence d'ADN ayant au moins un nucléotide et a spécialement pour objet une souche de levure transformée, dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène de sélection *URA3* et correspondant à une souche *atf2-Δ::URA3* transformée.

L'altération du gène de façon à perdre toute activité APAT, le gène *ATF2* ou un homologue de celui-ci ainsi que les souches hôtes ont les significations indiquées précédemment.

L'invention concerne tout spécialement une souche de levure transformée *atf2-Δ::URA3* ci-dessus exprimant la 3β-HSD et en particulier la souche de *S. cerevisiae* transformée dénommée TGY158/pTG10862 dont une construction détaillée est décrite plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi spécialement pour objet une souche de levure transformée ci-dessus, dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* et correspondant à une souche *atf2-Δ:: TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* transformée.

L'invention concerne aussi tout spécialement une souche transformée *atf2-Δ:: TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* ci-dessus exprimant *P<sub>450</sub>17α* et en particulier la souche de *S. cerevisiae* transformée, dénommée TGY186/pTG10435.

L'invention concerne particulièrement une souche de levure transformée *atf2-Δ:: TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* ci-dessus coexprimant la 3β-HSD et *P<sub>450</sub>17α* et tout particulièrement la souche *S. cerevisiae* transformée, dénommée TGY186/pTG10417.

L'invention a aussi pour objet un procédé d'oxydation *in vivo* d'un substrat choisi parmi un stérol endogène, un stérol



exogène ou un stéroïde exogène dans lequel on utilise une souche de levure transformée ci-dessus que, soit l'on cultive seule lorsque la souche génère le stérol endogène, soit l'on incube avec le stérol ou le stéroïde exogène et on isole éventuellement le composé oxydé obtenu.

Par stérol endogène, on entend un stérol accumulé dans une souche de levure et qui est un substrat de l'enzyme de clivage de la chaîne latérale ( $P_{450}SCC$ ) lorsque la levure, après transformation par exemple par un vecteur d'expression de  $P_{450}SCC$ , d'ADX et d'ADR, est cultivée en absence de stérol exogène. Les stérols endogènes utilisés pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention peuvent être par exemple l'ergosta 5-ène-3-ol, l'ergosta 5,24(28)-diène-3-ol ou l'ergosta 5,22-diène-3-ol. La demande de brevet européenne EP 727489 décrit l'accumulation de tels stérols dans une souche de levure et le clivage de leur chaîne latérale dans une culture de la souche après transformation par un vecteur d'expression de  $P_{450}SCC$ , d'ADX et d'ADR. Une telle souche de levure, dans laquelle l'activité APAT est aussi présente, peut être modifiée au préalable pour obtenir une souche mutante *atf2* selon l'invention, puis être transformée par un vecteur d'expression de  $P_{450}SCC$ , d'ADX et d'ADR pour obtenir une souche mutante *atf2* transformée selon l'invention.

Par stérol exogène, on entend un stérol qui est un substrat de l'enzyme de clivage  $P_{450}SCC$  par incubation avec une souche de levure transformée par un vecteur d'expression de  $P_{450}SCC$ , d'ADX et d'ADR, par exemple le cholestérol ou le sitostérol. Une telle souche peut être par exemple une souche mutante *atf2* transformée par un vecteur d'expression de  $P_{450}SCC$ , d'ADX et d'ADR.

Le  $3\beta$ -hydroxystéroïde obtenu par clivage de la chaîne latérale du stérol endogène ou exogène utilisé comme substrat est totalement sous forme libre, c'est-à-dire non accompagné de l'ester  $3\beta$ -acétique correspondant, dans les cultures de souches *atf2* transformées exprimant  $P_{450}SCC$ , ADX et ADR.

Par stéroïde, on entend un stéroïde qui est un substrat de l'enzyme  $3\beta$ -HSD par incubation avec une souche de levure transformée par exemple par un vecteur d'expression de la

3 $\beta$ -HSD, tel que la prégnénolone, la 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone ou la d hydro piandrosterone ou un stéroïde qui est un substrat de l'enzyme P<sub>450</sub>17 $\alpha$  par incubation avec une souche de levure transform e par exemple par un vecteur d'expression de P<sub>450</sub>17 $\alpha$ , tel que la progestérone ou la prégnénolone. Une telle souche peut être par exemple une souche mutante atf2 transform e par un vecteur d'expression de la 3 $\beta$ -HSD ou par un vecteur d'expression de P<sub>450</sub>17 $\alpha$  selon l'invention.

L'invention a particulièrement pour objet le procédé d'oxydation in vivo ci-dessus, dans lequel le substrat est un 3 $\beta$ -hydroxystéroïde et dans lequel on utilise une souche de levure atf2- $\Delta$ ::URA3 transform e exprimant la 3 $\beta$ -HSD et isole éventuellement le 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïde obtenu et a spécialement pour objet un procédé dans lequel le 3 $\beta$ -hydroxy stéroïde est choisi parmi la prégnénolone ou la 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone.

Le 3 $\beta$ -hydroxystéroïde utilisé comme substrat est stable lorsqu'on l'incube avec une souche atf2- $\Delta$ ::URA3 de l'invention transform e par un vecteur d'expression de 3 $\beta$ -HSD. L'invention fournit ainsi un procédé amélioré de production de 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïde dans une levure puisque la totalité du substrat 3 $\beta$ -hydroxy peut être oxyd e en 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïde, comme cela est montré plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé d'oxydation in vivo ci-dessus, dans lequel le substrat est un stéroïde et dans lequel on utilise une souche de levure atf2- $\Delta$ :: TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub> transform e exprimant P<sub>450</sub>17 $\alpha$  et isole éventuellement le stéroïde 17 $\alpha$ -hydroxylé obtenu et a spécialement pour objet un procédé dans lequel le substrat stéroïde est la prégnénolone ou la progestérone.

La prégnénolone utilis e comme substrat est stable lorsqu'on l'incube avec une souche atf2- $\Delta$ :: TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub> transform e par un vecteur d'expression de P<sub>450</sub>17 $\alpha$ .

L'invention fournit donc aussi un procédé amélioré de production de 17 $\alpha$ -hydroxystéroïdes à partir de 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes puisque la totalité du substrat 3 $\beta$ -hydroxy peut être 17 $\alpha$ -hydroxyl e.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé d'oxydation in vivo ci-dessus, dans lequel le substrat est un 3 $\beta$ -hydroxy stéroïde et dans lequel on utilise une souche de levure *atf2-Δ::TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* transformée coexprimant la 3 $\beta$ -HSD et P450-17 $\alpha$  et isole éventuellement le 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïde 17 $\alpha$ -hydroxylé obtenu. L'invention a spécialement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le substrat stéroïde est la prégnénolone.

Les souches de levure mutantes *atf2* transformées et le procédé de l'invention permettent de prévoir leur utilisation avantageuse dans la production améliorée de l'hydrocortisone ou de ses intermédiaires dans la levure.

Des exemples de construction de souches de l'invention et de mise en oeuvre du procédé de l'invention sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

## **Matériels et méthodes générales**

### **1. Souches et milieux**

Les souches de *S. cerevisiae* utilisées pour la réalisation de l'invention sont la souche TGY73.4 (*MATa, URA3-Δ5, pral-1, prb1-1, prc1-1, cps1-3, his*) dérivée isogénique *Leu<sup>+</sup>* de cl3ABYS86 décrite par Achstetter et al., 1992 et la souche Fyl679 (*MATa, URA3-52, trp1-Δ63, leu2-Δ1, his3-Δ200, fen1, GAL*) décrite par Thierry et al., 1990. La croissance des souches est effectuée sur milieu complet YPD (Difco Laboratories) contenant 2 % de glucose à 28°C selon les conditions décrites par F. Sherman, 1991.

Pour la transformation de *S. cerevisiae*, les cellules sont rendues compétentes par la méthode à l'acétate de lithium (Ito et al, 1983). Les levures sont cultivées en routine sur un milieu minimum synthétique SD contenant 2 % de glucose (F. Sherman, 1991) avec addition des besoins nutritionnels à la concentration de 100  $\mu$ g/ml.

La souche *E. coli* BJ5183 (D. Hanahan, 1983) a été utilisée pour la recombinaison in vivo et la souche *E. coli* C600, *hsdR* (Hubacek et al., 1970) a été utilisée comme souche receveuse pour les réactions classiques de ligation.

### **2. Manipulation de l'ADN et recombinaison in vivo dans *E. coli***

Les méthodes générales de biologie moléculaire utilisées sont décrites par Sambrook et al., 1989. La méthode pour la recombinaison in vivo a été décrite par E. Degryse, 1995 et E. Degryse, 1996.

### 5 3. Test de l'activité enzymatique APAT

L'activité acétyltransférase de l'APAT a été déterminée par mesure de l'incorporation de [<sup>3</sup>H]acétate dans la prégnénolone à partir de [<sup>3</sup>H]acétyl-CoA (New England Nuclear). Le milieu de réaction (500 µl) contient du [<sup>3</sup>H]acétyl-CoA (20 µM, 10 25 Ci/mole) et de la prégnénolone (Sigma) (30 µM). La prégnénolone est ajoutée en solution dans 2 µl de mélange tyloxapol (Sigma)/éthanol (1:1) dans un tampon phosphate de potassium (20mM) à pH 7,0. Après incubation pendant 15 minutes à 30°C, la réaction est stoppée par addition de 2 ml 15 de dichlorométhane.

Les stéroïdes sont extraits avec du dichlorométhane, puis séparés par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (noté plus loin RP-HPLC) dans des conditions d'élution isocratiques avec de l'acétonitrile sur une colonne 20 Ultrasphère ODS (Beckman) à 45°C sur un chromatographe HP 1090 (Hewlett Packard) couplé à un radiodétecteur FLO-One 500 (Packard) qui permet de mesurer la quantité de [<sup>3</sup>H]acétate de prégnénolone formée.

Une unité APAT est définie comme la quantité d'enzyme 25 qui produit 1 nmole d'acétate de prégnénolone par minute à 30°C, dans les conditions décrites ci-dessus.

### 4. Détermination de la concentration en protéine

La concentration en protéine a été mesurée en utilisant la trousse "protein assay kit" (Bio-Rad) avec de l'albumine 30 de sérum de boeuf comme standard.

Les figures ci-annexées illustrent certains aspects de l'invention.

La figure 1 représente la voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol, chez les mammi- 35 fères.

Les figures 2A et 2B illustrent la bioconversion de la prégnénolone en acétate de prégnénolone chez *S. cerevisiae*. L'analyse est faite par RP-HPLC à 205 nm :

La figure 2A montre la cinétique de formation de l'acétate de prégnénolone et de disparition de la prégnénolone à des intervalles de temps sur 12 h d'incubation.

La figure 2B montre le profil en stéroïdes à t=0 et à t=10 h par rapport à un profil de standards de prégnénolone et d'acétate de prégnénolone.

La figure 3 illustre la purification de l'APAT par chromatographie sur MonoP HR 5/20 :

(A) montre le profil de l'activité APAT présente dans les fractions 10 à 20.

(B) montre l'analyse par SDS-PAGE des fractions 14, 15 et 16 réunies et concentrées par coloration au bleu de Coomassie (ligne 2) en présence de marqueurs de poids moléculaire (ligne 1). La flèche indique la bande de PM apparent de 62kDa.

La figure 4 représente la séquence en acides aminés en code à une lettre de la protéine YGR177c. Les peptides séquencés à partir de la protéine APAT purifiée et digérée par la trypsine sont soulignés.

La figure 5 représente la stratégie d'interruption du gène *ATF2* par association au gène *URA3* par la méthode de double fusion PCR. Les barres vides et les barres pleines représentent les séquences d'*ATF2* et d'*URA3* respectivement.

La figure 6 illustre l'effet de l'interruption du gène *ATF2* dans *S. cerevisiae* sur l'acétylation de la prégnénolone. La présence de prégnénolone acétate est mise en évidence par RP-HPLC à 205 nm à partir de cultures de 16 h de la souche parente TGY73.4 (A) ou de la souche mutante TGY158 (B).

Les figures 7A, 7B et 7C représentent le schéma de construction des plasmides d'expression de la 3 $\beta$ -HSD humaine chez la levure, pTG10832 et pTG10862. La figure 7A décrit l'obtention du fragment *MscI*-*MluI* contenant la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD humaine. La figure 7B décrit l'obtention du fragment *NotI* contenant le bloc d'expression *CYC1<sub>p</sub>*/3 $\beta$ -HSD/*PGK<sub>t</sub>*. La figure 7C décrit l'obtention du plasmide pTG10832 et du plasmide pTG10862.

La figure 8 représente une carte de restriction du plasmide pTG10832.

La figure 9 représente une carte de restriction du plasmide pTG10862.

La figure 10 représente le schéma de construction du plasmide d'expression pTG10435.

5 La figure 11 représente le schéma de construction du plasmide pTG10058.

La figure 12 représente une carte de restriction du plasmide pTG10058.

10 La figure 13 représente une carte de restriction du plasmide pTG10293.

La figure 14 représente une carte de restriction du plasmide pTG10435.

Les figures 15A et 15B représentent le schéma de construction du plasmide pTG10274 :

15 La figure 15A décrit l'obtention du plasmide pTG10214. La figure 15B décrit l'obtention du plasmide pTG10274.

La figure 16 représente une carte de restriction du plasmide pTG10274.

20 La figure 17 représente une carte de restriction du plasmide pTG10401.

La figure 18 représente le schéma de construction du vecteur d'expression pTG10262.

La figure 19 représente une carte de restriction du plasmide pTG10262.

25 La figure 20 représente une carte de restriction du plasmide pTG10403.

La figure 21 représente une carte de restriction du plasmide pTG10417.

(Abréviations des enzymes de restriction : S, Sall ; N, NotI ;  
30 BII, BglII ; M, MluI, C, ClaI ; N°, site NcoI perdu ; XbaI°, site XbaI perdu ; E, EcoRI).

**EXEMPLE 1 : Identification de l'activité APAT de la levure.**

**A - Acétylation in vivo de la prégnénolone par la levure.**

35 La souche TGY73.4 a été cultivée à 28°C dans 10 ml de milieu YPD (Difco) inoculé à A600=0,1 à partir d'une préculture de 24 h et dans lesquels ont été ajoutés 100 µl d'une solution de prégnénolone à 10 mg/ml dans un mélange

tergitol (Sigma)/ éthanol (1:1). Les stéroïdes formés ont été identifiés sur des aliquots de 250 µl de bouillon prélevés à intervalles de temps pendant 10 h. Après extraction avec 2 ml de dichlorométhane, les phases organiques ont été évaporées sous azote, puis les résidus obtenus ont été redissous dans de l'acétonitrile. Les stéroïdes ont été analysés par RP-HPLC sur une colonne Ultrasphère ODS (Beckman) avec successivement comme éluant : acétonitrile à 60 % dans l'eau pendant 10 mn, puis acétonitrile variant de 60 à 80 % dans l'eau pendant 5 mn, puis acétonitrile à 80 % pendant 5 mn au débit de 1 ml/mn, à 45°C et avec une détection à 205 nm.

Les chromatogrammes obtenus (figure 2B) montrent que la prégnénolone est métabolisée en un produit plus apolaire et ayant un TR identique à celui de la prégnénolone acétate standard. La figure 2A montre que la prégnénolone est rapidement convertie par la levure en son métabolite.

Après traitement alcalin (KOH à 6 % dans du méthanol), le métabolite observé libère un produit ayant un TR identique à celui de la prégnénolone. L'identification du métabolite à l'acétate de prégnénolone a été ensuite confirmée par spectrométrie de masse.

#### **B - Purification de l'enzyme ayant l'activité APAT.**

La souche TGY73.4 a été cultivée en fermenteur de 10 litres dans le milieu Käppeli (Fiechter et al., 1981) enrichi en glucose à 160 g/l à 30°C jusqu'à A600=30. Les cellules ont été séparées par centrifugation, lavées à l'eau puis remises en suspension dans 4 litres de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 à 4°C (tampon A) contenant 1 mM de PMSF. Les cellules ont été soumises à un éclatement dans un homogénéiseur Manton Gaulin sous une pression de 1000 psi. Le lysat cellulaire obtenu a été centrifugé à 12.000 xg pendant 15 mn à 4°C, puis du chlorure de zinc a été ajouté au surnageant à une concentration finale 40 mM. Le pH a été ajusté à 5.5 avec HCl 1N et la précipitation a été réalisée pendant 30 mn à 4°C. Après centrifugation à 10.000 xg pendant 10 mn à 4°C, le précipité isolé a été remis en suspension dans 3 litres de tampon A contenant de l'EDTA 100 mM et du PSFM 1 mM. Après élimination de l'EDTA par diafiltration sur

une cartouche Y10S10 (Amicon) contre 30 litres du tampon A, le rétentat a été chargé à la vitesse de 35 ml/mn et à 4°C sur une colonne de 1,5 litres de DEAE-Sephacel (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le tampon A. Après lavage de la

5 colonne avec le tampon A, puis avec le tampon A contenant du NaCl 0,15M, l'activité APAT a été éluée avec le tampon A contenant du NaCl 0,4M. Les fractions de DEAE-Sephacel contenant l'activité APAT, mesurée comme indiqué ci-dessus dans "Matériels et Méthodes générales", ont été réunies,

10 additionnées de NaCl à la concentration finale de 2M, puis chargées à la vitesse de 15 ml/mn et à 4°C sur une colonne de 500 ml de Phényl-Sepharose (Pharmacia) préalablement équilibrée dans le tampon A contenant du NaCl 2M. Après lavage de la colonne avec le tampon A contenant NaCl 0,5M, l'activité

15 APAT est éluée avec 1,5 litres d'un gradient linéaire de cholate de sodium variant de 0 à 1 % dans le tampon A. Les fractions contenant l'activité APAT ont été réunies, puis concentrées par ultrafiltration sur une membrane YM10 (Amicon), puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

20 L'ensemble du procédé a été répété une fois de façon à préparer du matériel en quantité suffisante pour continuer la purification.

Le matériel purifié à partir des deux préparations ci-dessus a été décongelé, puis chargé à la vitesse de 4 ml/mn

25 et à 4°C sur une colonne de 100 ml de Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) préalablement équilibrée dans le tampon A. Après lavage de la colonne avec le même tampon, l'activité APAT a été éluée avec 500 ml d'un gradient linéaire de NaCl variant de 0 à 1M dans le même tampon. Les fractions de Q-Sepharose

30 contenant l'activité APAT ont été réunies puis chargées directement à la vitesse de 2,5 ml/mn et à 4°C sur une colonne de 7 ml de cholate de sodium immobilisé sur des billes de Sepharose (Pharmacia) équilibrée préalablement avec

35 du tampon A contenant du NaCl 0,5M. Après lavage de la colonne avec le même tampon, l'activité APAT a été éluée avec 100 ml d'un gradient linéaire de cholate de sodium variant de 0 à 1 % dans le même tampon. Les fractions contenant l'activité APAT ont été réunies, concentrées par



ultrafiltration sur une membrane YM10 (Amicon) jusqu'à une concentration en protéine de 1,8 mg/ml, puis conservées à -80°C.

L'activité APAT a été ainsi purifiée environ 500 fois sur la base de l'activité spécifique et avec un rendement d'environ 16 % comme montré au tableau 1 suivant :

Tableau 1

Stade	Activité APAT (unités)	Protéine (mg)	Activité spécifique (unités/mg)	Purification	Rendement
Surnageant 12.000g	8 057	42 242	0,19	1	100
Précipitation au zinc	10 453	28 040	0,37	1,9	129
DEAE-Sephacel	6 399	5 009	1,28	6,7	79
Phényl-Sephrose	3 316	489	6,78	35,7	41
Q-Sephrose	1 712	39	43,9	231	21
Cholate-Sephrose	1 300	13	100	526	16

10

La moitié du matériel semi-purifié obtenu ci-dessus (environ 6 mg de protéine) a été ensuite décongelée puis additionnée de PEG 4000 (Prolabo) à la concentration finale de 20 % (p/v) pour éliminer le cholate et le NaCl. Après agitation pendant 30 mn à 4°C, le précipité a été recueilli par centrifugation à 12.000 xg pendant 30 mn à 4°C, puis redissous dans 4 ml de tampon A. La solution ainsi obtenue a ensuite été chargée à la vitesse de 1 ml/mn sur une colonne de MonoP HR5/20 (Pharmacia) préalablement équilibrée avec le tampon bis-Tris 25 mM pH 6,3. L'activité APAT a été éluée avec le tampon Polybuffer 74 pH 4,0 (Pharmacia). Des fractions de 1 ml ont été recueillies en présence chacune de 50 µl de tampon Tris-HCl 2M, pH 8.0 de façon à limiter l'inactivation de l'enzyme à pH acide. Les fractions 14, 15 et 16 (figure 3(A)) contenant l'activité APAT la plus élevée, mesurée comme indiquée ci-dessus, ont été réunies, concentrées par ultrafiltration sur membrane YM10, puis conservées

à -80°C avant utilisation. La fraction active ainsi obtenue a été soumise à une SDS-PAGE sur gel à 10 % de polyacrylamide. Plusieurs bandes ont été révélées par coloration au bleu de Coomassie avec une bande majoritaire d'un PM apparent de 5 62kDa (figure 3(B)), identique au PM déterminé par filtration sur gel de Superose 6 (Pharmacia) et correspondant à l'activité APAT.

### C - Propriétés de l'APAT.

#### a) Spécificité de substrat

10 Selon la méthode indiquée ci-dessus pour l'acétyl CoA et la prégnénolone, en utilisant différents donneurs d'acyle ou différents substrats stéroïdes, l'APAT semi-purifiée transfert l'acétate sur des 3 $\beta$ -ol, delta<sup>4</sup> ou delta<sup>5</sup>-stéroïdes avec une efficacité comparable alors que le transfert est faible 15 sur les estrogènes et non détectable sur les stérols et avec une préférence marquée pour l'acétyl-CoA comme donneur d'acyle.

Le tableau 2 suivant, dans lequel pour a) les essais sont effectués avec 30  $\mu$ M de chaque stéroïde testé et 100  $\mu$ M 20 de [<sup>3</sup>H]acétyl-CoA et pour b) les essais sont effectués avec 100  $\mu$ M de chaque donneur d'acyle et 30  $\mu$ M de [<sup>3</sup>H] prégnénolone, montre les résultats obtenus :

Tableau 2

Substrat a)	Activité relative (%)	Substrat b)	Activité relative (%)
Prégnénolone	100	acétyl-CoA	100
17 $\alpha$ -OH prégnénolone	89	propionyl-CoA	33
DHEA	104	butyryl-CoA	16
4-pregnène-3 $\beta$ ol-20-one	70	hexanoyl-CoA	18
5 $\beta$ -pregnane-3 $\beta$ ol-20-one	1,8	oléoyl-CoA	non détectée
17 $\beta$ -oestradiol	5		
oestrone	2,5		
cholestérol	0,6		
ergostérol	0,4		

#### b) Inhibition

L'activité APAT est fortement inhibée par les réactifs des groupements sulfhydryles tels que NEM et DTNB. L'inhibi-

tion est complète en présence de chlorure de zinc (1 mM).

**D - Séquence partielle en acides aminés.**

La séquence partielle en acides aminés a été déterminée après digestion à la trypsine sur des coupes de gel selon la méthode décrite par Rosenfeld et al. (1992).

A partir des deux tiers du concentrat obtenu ci-dessus puis séparé par SDS-PAGE, la bande 62kDa a été découpée puis incubée avec de la trypsine (Promega). Les peptides générés ont été ensuite séparés par RP-HPLC sur une colonne Vydac 218TP (1,5 x 125 mm) à la vitesse de 100 µl/mn, en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile variant de 0 à 60 % en 80 mn, puis de 60 à 100 % en 20 mn dans une solution de TFA à 0,1 % dans l'eau puis ont été soumis à un séquençage en acides aminés.

La séquence N-terminale a été déterminée sur un séquenceur de protéine Model 477A couplé à un analyseur HPLC de PTH-amino acids (Applied Biosystems).

Parmi les échantillons séquencés, deux pics x et y donnent une séquence non ambiguë constituée respectivement des 10 et 16 acides aminés suivants :

pour le pic x : ISEQFKKDDF

pour le pic y : LIELISPVIIPLGNNPK

Les deux séquences peptidiques ainsi obtenues ont été utilisées pour cribler la base de données du génome de *S. cerevisiae*. Une protéine de 62kDa dont la séquence contient exactement les séquences des deux peptides ci-dessus a pu être identifiée (Mips, accession S64491, Hebling et al., May 1996). Cette protéine dont la séquence est montrée à la figure 4 et dont la fonction n'a pas été décrite serait codée par un gène au locus YGR177c. Sur la base d'une identité d'environ 37 % de séquence en acides aminés entre la protéine de l'invention ayant une activité acyltransférase et le produit du gène ATF1 chez *S. cerevisiae* décrit par Fujii et al. (1994) et auquel a été attribué une activité alcool acétyltransférase, nous utiliserons la dénomination ATF2 pour le gène codant pour la protéine responsable de l'activité APAT chez *S. cerevisiae*.

**EXEMPLE 2 : Construction de souches de levure ayant le gène**

**ATF2** interrompu par le gène **URA3** et ayant perdu l'activité **APAT** (**atf2-Δ::URA3**).

**A) Ciblage du gène ATF2.**

Le gène **URA3** de *S. cerevisiae* a été introduit par substitution d'une partie choisie du gène **ATF2** de *S. cerevisiae* permettant une sélection ultérieure des souches mutantes par prototrophie à l'uracile.

Le marqueur de sélection **URA3** a été associé au gène **ATF2** par double fusion PCR selon la méthode décrite par Amberg et al., 1995. La stratégie suivie montrée à la figure 5 comprend au total 4 réactions de PCR. Les deux premières réactions (noté PCR1) permettent respectivement d'amplifier les régions 5' et 3' flanquant le site d'insertion du marqueur **URA3** dans le gène cible **ATF2** interrompu et la troisième réaction (noté PCR2) permet d'amplifier le gène marqueur **URA3**. La double fusion (noté PCR3) permet enfin l'association des régions 5' et 3' du gène cible **ATF2** au gène marqueur **URA3** (noté 5'**ATF2-URA3-3'ATF2**).

Dans un premier temps, un échantillon de cellules entières de la souche Fy1679 utilisée comme source d'ADN du gène cible **ATF2** a été amplifié dans le tampon PCR contenant du dNTP 2 mM (Pharmacia) dans les conditions suivantes : 25 cycles ; 93°C, 30 sec ; 54°C, 2 mn ; 68°C, 3 mn suivi d'une élongation de 5 mn à 72°C ; polymérase Ampli Taq (Perkin Elmer).

D'une part, la région 5' du gène **ATF2** a été amplifiée par PCR en utilisant comme amorces directe et indirecte les oligonucléotides ayant les séquences suivantes :

OTG10841 : AAAAGTCGACAAAATGGAAGATATAGAAGGATACGAACCACATATCACTC  
(SEQ ID N°1)

et

OTG10844 : ATCAATCTCCAATTAGGCCTCTTCGGATTACCC (SEQ ID N°2)  
qui contiennent une région homologue à la région 5' de la séquence du gène **ATF2** (SGD : YGR177c) et en ajoutant un site de restriction **SalI** pour l'OTG10841.

D'autre part, la région 3' du gène **ATF2** a été amplifiée par PCR en utilisant comme amorces directe et indirecte les oligonucléotides ayant les séquences suivantes :

OTG10846 : CATTCGACATTCCCGAAGGTGACAATGACAAG (SEQ ID N°3)

et

OTG10842 : AAAAACGCGTAACTATTAAAGCGACGCAAATTCGCCGATGGTTTGG  
(SEQ ID N°4)

- 5 qui contiennent des régions homologues à la région 3' de la séquence du gène *ATF2* (SGD : YGR177c) et en ajoutant un site de restriction *MluI* pour l'OTG10842.

Dans un deuxième temps, le gène *URA3* de *S. cerevisiae* a été amplifié par PCR en utilisant comme amorce directe

- 10 l'oligonucléotide ayant la séquence :

OTG10843 :

GGGTAATCCGAAGAGGCCTAATTGGAGATTGATAAGCTTTTCAATTCAATTCATCATTTTT  
TTTTTATTCTTTTTTTTGG (SEQ ID N°5)

- qui contient une séquence homologue à la région 5' de la  
15 séquence du gène *URA3* publiée (Rose et al., 1984 ; GenBank : YSCODCD accession : K02207 ; SGD : YEL021w) associée à une séquence homologue à la région 5' du gène *ATF2* (complémentaire à l'OTG10844) et comme amorce indirecte l'oligonucléotide ayant la séquence :

- 20 OTG10845 :

CTTGTCATTGTCACCTTCGGGAATGTCGAATGGGGTAATAACTGATATAATTAAATTGAAC  
TC (SEQ ID N°6)

- qui contient une séquence homologue à la région 3' du gène  
*URA3* associée à une séquence homologue à la région 3' du gène  
25 *ATF2* (complémentaire à l'OTG10846). Un échantillon de 20 ng d'ADN du gène *URA3*, isolé à partir du vecteur navette *E. coli*-levure pTG10021 (Degryse et al., 1995) par digestion avec l'enzyme de restriction *HindIII* a été amplifié dans les conditions indiquées ci-dessus.

- 30 Les produits de PCR respectivement obtenus ont été purifiés en utilisant la trousse "Geneclean kit" (Bio 101 Inc, La Jolla, USA), puis soumis à la réaction de double fusion en utilisant comme amorces les oligonucléotides OTG10841 et OTG10842 ci-dessus dans les conditions d'amplifi-  
35 cation utilisées pour les réactions préalables de PCR avec un programme de 20 cycles.

Après purification du produit final de fusion qui contient les régions flanquantes du gène *ATF2* fusionnées au

gène *URA3* fonctionnel, la présence du gène *URA3* a été confirmée par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRV* qui montre la présence de ce site dans le matériel amplifié.

**B) Génération de souches de levure *atf2-Δ::URA3*.**

5 Le produit de fusion obtenu ci-dessus a été transformé directement dans les cellules compétentes de la souche Fy1679 ou de la souche TGY73.4 et les transformants ont été sélectionnés par croissance sur le milieu SD (F. Sherman, 1991) en présence des exigences nutritionnelles de la souche et en  
10 absence d'uracile.

A partir de clones isolés, la nouvelle association entre la région 5' du gène *ATF2* et le gène *URA3* (5'*ATF2-URA3-3'ATF2*) a été montrée par amplification par PCR sur des cellules entières en utilisant les amorces OTG10841 et  
15 OTG10845 ci-dessus. L'absence de l'activité APAT a été ensuite montrée in vitro selon le test décrit à partir d'homogénat cellulaire, comparativement à la souche parente qui montre une activité APAT marquée.

Les souches répondant à ces critères ont ainsi été  
20 caractérisées comme des souches mutantes *atf2*, noté *atf2-Δ::URA3*. Une souche mutante ainsi obtenue à partir de la souche parente Fy1679 a été dénommée TGY156 et une souche mutante obtenue à partir de la souche parente TGY73.4 a été dénommée TGY158.

25 Un échantillon de la souche TGY156 a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) INSTITUT PASTEUR, 25, Rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE, le 2 février 1998 sous le numéro I-1977.

Un échantillon de la souche TGY158 a été déposé à la  
30 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) INSTITUT PASTEUR, 25, Rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE, le 2 février 1998 sous le numéro I-1976.

**C) Stabilisation de la prégnénolone in vivo dans les cultures de souches de levure *atf2-Δ::URA3*.**

35 Les cellules de la souche TGY158 obtenue ci-dessus ont été inoculées à A600=0,1 dans le milieu YPD (Difco) contenant 100 µg/ml de prégnénolone. Après 16 heures d'incubation à 28°C, les stéroïdes ont été extraits avec du dichlorométhane

et analysés par RP-HPLC comme indiqué ci-dessus. La figure 6(B) montre que le mutant TGY158 a perdu la capacité d'estérifier la prégnénolone alors que dans les mêmes conditions de culture, la souche parente TGY73.4 convertit la prégnénolone en prégnénolone acétate (figure 6(A)).

Ces résultats permettent de conclure que le produit du gène *ATF2* est responsable de l'estérification de la prégnénolone par la levure alors que l'interruption du gène *ATF2* n'a pas conduit à des modifications apparentes de la croissance cellulaire dans des conditions normales.

**EXEMPLE 3 : Construction d'une souche de levure ayant le gène *ATF2* interrompu par le gène *URA3* et exprimant la 3 $\beta$ -HSD**

Des plasmides 2 $\mu$  portant une séquence d'ADNc codant pour la 3 $\beta$ -HSD humaine sous le contrôle du promoteur *CYC1* de *S. cerevisiae* ou du promoteur *TEF1* de *S. cerevisiae* et portant le gène de résistance à G418 ont été construits selon le schéma des figures 7A à 7C, puis transformés dans des souches de levure mutantes *atf2-Δ::URA3*.

Dans un premier temps, un vecteur de transfert pTG10095, contenant la séquence d'ADNc codant pour la 3 $\beta$ -HSD humaine type II décrit par E. Rhéaume et al., 1991 flanquée par les sites *SalI* et *MluI* et située en aval du promoteur de levure *GAL10/CYC1*, a été généré de la façon suivante :

La séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD a été sousclonée par E. Rhéaume et al., 1991 comme un fragment de restriction *SalI-NotI* dans les mêmes sites du vecteur Bluescript II (Stratagène). Le vecteur obtenu décrit par E. Rhéaume et al., 1991 contient un site *NotI* localisé à l'extrémité 3' de la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD. Ce vecteur a été ensuite digéré par l'enzyme de restriction *NotI*, puis traité par le fragment de Klenow en présence de dNTP afin de remplir les extrémités cohésives, puis religaturé en présence de l'oligonucléotide ayant la séquence suivante :

OTG4461 : CACACGCGTGTG (SEQ ID N°7)

préalablement phosphorylé et hybridé sur lui-même, de façon à introduire un site *MluI*. Le vecteur pTG10082 (fig. 7A) ainsi obtenu contient la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD contenant un site *BglII* et bordée par les sites *SalI* et *MluI* tandis que

le site *NotI* a été perdu. Ce vecteur contient encore la région naturelle 5' non codante identifiée par la présence d'un site *BglIII*.

Afin de rapprocher le site *SalI* de l'ATG initiateur en  
5 amont duquel on désire introduire le promoteur *GAL10/CYC1*, le vecteur pTG10082 a été digéré par l'enzyme de restriction *MscI* dont le site est situé dans la région 5' non codante et juste en amont de l'ATG initiateur et par l'enzyme de restriction *MluI*. Le fragment *MscI-MluI* de 1,8 kb, contenant  
10 la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD (fig. 7A), a été isolé puis ligaturé dans le plasmide pTG10033 (E. Degryse et al., 1995) contenant le promoteur *GAL10/CYC1*, préalablement digéré par l'enzyme de restriction *SalI*, puis traité par le fragment de Klenow en présence de dNTP, puis digéré par l'enzyme de  
15 restriction *MluI*. Le vecteur pTG10095 (fig. 7B) est ainsi obtenu.

Dans un second temps, le vecteur de recombinaison pTG10268 contenant le plasmide 2 $\mu$  de levure, un replicon d'*E. coli*, une cassette d'expression *CYC1<sub>prom</sub>-PGK<sub>term</sub>* et le  
20 marqueur de sélection *LEU2* (fig. 7B), a été construit. Ce vecteur est identique au vecteur pTG10159 décrit (E. Degryse et al., 1995), à l'exception du site *XbaI* contenu dans la région 2 $\mu$  qui a été remplacé par un marqueur *XbaI*<sup>o</sup> obtenu par remplissage du site naturel *XbaI* en présence du fragment de  
25 Klenow, puis par religature.

Le plasmide d'expression pTG10268 a été ensuite généré par recombinaison homologue par introduction du bloc d'expression contenant le promoteur *GAL10/CYC1<sub>p</sub>*, obtenu à partir du plasmide pTG10095 préparé ci-dessus puis digéré par  
30 l'enzyme de restriction *NotI*, dans le plasmide pTG10260 préalablement digéré par les enzymes de restriction *SalI* et *MluI*. Le plasmide pTG10268 (figure 7B) contient la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD humaine type II sous le contrôle du promoteur *CYC1*.

35 Le plasmide d'expression pTG10862 contenant la séquence codante pour la 3 $\beta$ -HSD sous le contrôle du promoteur *TEF1* a été ensuite construit de la façon suivante (figure 7C) :

Le plasmide pTG10832 (figure 8) a d'abord été construit



par recombinaison homologue entre le fragment *NotI* obtenu à partir du plasmide pTG10268 préparé ci-dessus, puis digéré par l'enzyme de restriction *NotI* et le plasmide de recombinaison pTG10164 (E. Degryse et al., 1995) préalablement

5 digéré par les enzymes de restriction *SalI* et *MluI*.

Le plasmide d'expression pTG10862 a été ensuite obtenu par introduction du promoteur *TEF1*, contenu dans le fragment *ClaI-SalI* isolé à partir du plasmide pTG10085 (E. Degryse et al., 1995), à la place du promoteur *CYC1* excisé par digestion  
10 du plasmide pTG10832 construit ci-dessus par les enzymes de restriction *ClaI* et *SalI*.

Le plasmide pTG10862 ainsi obtenu (figure 9) et contenant la séquence d'ADNc codant pour la 3 $\beta$ -HSD humaine type II a été transformé respectivement dans la souche parente  
15 TGY73.4 ou dans son mutant *atf2- $\Delta$ ::URA3* correspondant à la souche TGY158 obtenue à l'exemple 2 ainsi que dans la souche parente FY1679 ou dans son mutant *atf2- $\Delta$ ::URA3* correspondant à la souche TGY156 obtenue à l'exemple 2. Les transformants ont été isolés comme indiqué ci-dessus sur le milieu YPD  
20 (Difco) contenant du G418 à 250  $\mu$ g/ml.

Les colonies-candidates ainsi obtenues ont été ensuite précultivées sur le milieu SD contenant les éléments nutritionnels nécessaires pour chaque souche (histidine et uracile pour la souche TGY73.4 ; histidine pour TGY158 ; tryptophane,  
25 histidine, leucine et uracile pour la souche FY1679 ; tryptophane, histidine et leucine pour la souche TGY156 ; à la concentration de 100  $\mu$ g/ml chacun), puis inoculées dans un milieu contenant de 100  $\mu$ g/ml de prégnénolone. Après 24 h de croissance et bioconversion à 28°C, les stéroïdes ont été  
30 extraits et mesurés par RP-HPLC comme indiqué ci-dessus. Les résultats obtenus, mesurés sur 3 clones de chaque souche, sont montrés dans le tableau 3 suivant :

Tableau 3

Souche	Plasmide	Prégnénolone ( $\mu\text{g/ml}$ )	Progestérone ( $\mu\text{g/ml}$ )
TGY73.4	pTG10862	1	0
TGY158	"	94	15,2
FY1679	"	1	1,3
TGY156	"	100	13

Ces résultats montrent que le substrat prégnénolone est  
 5 récupéré presque quantitativement dans les souches mutantes  
 TGY156 ou TGY158 dans lesquelles un début de bioconversion de  
 la prégnénolone en progestérone est observée alors que la  
 disparition de la prégnénolone est complète dans les souches  
 parentes TGY73.4 ou FY1679 qui ne produisent pas ou très peu  
 10 de la progestérone, mais accumulent de l'acétate de prégné-  
 none comme cela a été montré à l'exemple 2.

Un échantillon de la souche transformée TGY158/pTG10862  
 a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de  
 Microorganismes (CNCM) INSTITUT PASTEUR, 25, Rue du Docteur  
 15 Roux 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE, le 2 février 1998 sous le  
 numéro I-1978.

**Exemple 4 : Construction d'une souche de levure ayant le gène  
 ATF2 interrompu par  $TEF1_{prom}/PGK_{term}$  ( $atf2-\Delta::TEF1/PGK$ ).**

La souche TGY186, qui est une souche dérivée de la souche  
 20 TGY156 ( $atf2-\Delta::URA3$ ) décrite à l'exemple 2 dans laquelle le  
 gène *URA3* au locus *ATF2* a été remplacé par le bloc  
 d'expression  $TEF1_{prom}/PGK_{term}$ , a été construite de la façon  
 suivante :

Dans un premier temps, le bloc d'expression  $TEF1_{prom}/PGK_{term}$  a  
 25 été associé au gène *ATF2* par double fusion PCR en suivant les  
 conditions décrites à l'exemple 2, mais en utilisant le bloc  
 d'expression  $TEF1_{prom}/PGK_{term}$  de *S.cerevisiae* décrit par E.  
 Degryse et al., 1995 au lieu du marqueur de sélection *URA3*.  
 Les deux premières réactions de PCR (PCR1) permettant  
 30 respectivement d'amplifier les régions codantes 5' et 3' du

gène *ATF2* flanquant le site d'insertion du bloc *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* dans le gène cible *ATF2* interrompu, ont été réalisées en utilisant respectivement comme amorces directe et indirecte pour la région 5', les oligonucléotides ayant les séquences

5 suivantes :

OTG11049 :

CTCTCTGTCGACAAAATGGAAGATATAGAAGGATACGAACCACATATCACTC (SEQ ID N°8) et

OTG10844 : ATCAATCTCCAATTAGGCCTCTTCGGATTACCC (SEQ ID N°9)

10 pour la région 3', les oligonucléotides ayant les séquences suivantes :

OTG10846 : CATTCGACATTCCCGAAGGTGACAATGACAAG. (SEQ ID N°10) et

OTG11050 : AACAAACACGCGTAACTATTAAAGCGACGCAAATTCGCCGATGCTTTGG (SEQ ID N°11).

15 Les amorces OTG11049 et OTG11050 ont été désignées pour introduire respectivement les sites de restriction *SalI* et *MluI*.

La troisième réaction de PCR (PCR2) permettant d'amplifier le bloc *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* a été réalisée en utilisant respectivement  
20 comme amorces directe et indirecte les oligonucléotides ayant les séquences suivantes :

OTG11052 :

GGGTAATCCGAAGAGGCCTAATTGGAGATTGATATCGATCACACACCATAGCTTCAAAATG TTTCTAC (SEQ ID N°12) et

25 OTG11053 :

CTTGTCATTGTTCACCTTCGGGAATGTCGAAGCTTCGAAACGCAGAATTTTCGAGTTATTAA ACTTAA (SEQ ID N°13)

qui introduisent les sites de restriction *ClaI* et *HindIII*.

Finalement, l'association a été réalisée par double fusion

30 des produits de PCR obtenus ci-dessus en utilisant comme amorces les oligonucléotides ayant les séquences OTG11049 (SEQ ID N°8) et OTG11050 (SEQ ID N°11) ci-dessus qui introduisent les sites de restriction *SalI* et *MluI* aux sites de jonction *ATF2*.

35 Après purification, le produit final de fusion a ensuite été recombiné avec le gène *ATF2* contenu dans le plasmide pTG10885 construit comme indiqué ci-dessous et préalablement digéré avec les enzymes de restriction *BstI* et *StuI*. Le plasmide

pTG10888, contenant le signal *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* aux sites *ClaI* et *HindIII* bordé par les régions flanquantes du gène *ATF2*, est ainsi obtenu.

La préparation du plasmide pTG10885 comprend l'amplification  
5 du gène *ATF2* à partir de la souche FY1679 en suivant les conditions décrites à l'exemple 2, mais en utilisant respectivement comme amorces directe et indirecte les oligonucléotides ayant les séquences OTG11049 (SEQ ID N°8) et OTG11050 (SEQ ID N°11) ci-dessus qui introduisent des sites  
10 de restriction *SalI* et *MluI*. Dans le produit de PCR obtenu, ces sites ont été ensuite éliminés par digestion avec les enzymes de restriction *SalI* et *MluI*, puis traitement avec le fragment de Klenow de la polymérase I d'*E. coli*, de façon à remplir les extrémités collantes. Le fragment obtenu a été  
15 ensuite ligaturé dans le vecteur d'expression pTG10031 décrit par E. Degryse et al., 1995, préalablement digéré avec les enzymes *ClaI* et *HindIII*, puis traité avec le fragment de Klenow. Par transformation dans *E. coli*, le plasmide pTG10885 est ainsi obtenu, résultant de la ligation du site *SalI* du  
20 produit de PCR, rempli en utilisant le fragment de Klenow de façon à obtenir la séquence GTCGA, avec le site *HindIII* du vecteur, rempli en utilisant le fragment de Klenow de façon à obtenir la séquence AGCTT, de manière à reconstruire le site *HindIII* (GTCGAAGCTT) (SEQ ID N°14) et à perdre le site *ClaI*.  
25 Le site *ClaI* du vecteur, rempli en utilisant le fragment de Klenow de façon à obtenir la séquence ATCG est perdu après ligation au produit de PCR.

Le signal *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* a été ensuite excisé du plasmide pTG10888 sous forme d'un fragment *NotI* de 1,8 kb, puis a été  
30 échangé avec le marqueur *URA3* dans la souche TGY156 (*atf2-Δ::URA3*).

La souche TGY156, préparée à l'exemple 2, utilisée comme souche hôte a été co-transformée avec l'ADN excisé du plasmide pTG10888 et avec le vecteur de levure contenant une  
35 origine ARS, dénommé YRp7, décrit par Struhl et al., 1979 qui permet de compléter l'exigence en tryptophane de la souche TGY156 et une détection sélective des colonies par leur résistance à l'acide 5-fluoroorotique (5-FO).

2 à 5  $\mu\text{g}$  de l'ADN excisé du plasmide pTG10888 par digestion avec l'enzyme de restriction *NotI* et de plasmide YRp7 ont été introduits dans la souche TGY156 par la méthode à l'acétate de lithium (Ito et al., 1983). La sélection pour la

5 complémentation de l'exigence en tryptophane de la souche a été ensuite réalisée après étalement sur des boîtes d'agar en milieu YNGB (Difco) enrichi en histidine et en leucine (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de chacun). Les colonies candidates, prélevées à l'aide d'un cure-dent, ont été ensuite placées sur un milieu

10 contenant du 5-FO préparé selon Boeke et al., 1984 puis la résistance au 5-FO a été confirmée sur le même milieu, la perte éventuelle du vecteur YRp7 dans les résistants à 5-FO étant indiquée par une exigence en tryptophane. Parmi les clones ainsi sélectionnés, l'association du gène *ATF2* avec

15 *TEF1<sub>prom</sub>* et *PGK<sub>term</sub>* a été contrôlée par PCR. La souche TGY186 est ainsi obtenue.

**Exemple 5 : Construction d'une souche de levure ayant le gène *ATF2* interrompu par *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* et exprimant *P<sub>450</sub>17 $\alpha$* .**

Un plasmide (pTG10435) contenant une origine de répllication

20 de levure ARSH4/CEN6, le marqueur de sélection *URA3* et portant une séquence d'ADNc codant pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  bovin sous le contrôle du promoteur *TEF1* de *S. cerevisiae* a été construit selon le schéma de la figure 10, puis transformé dans une souche de levure mutante *atf2- $\Delta$ ::TEF1/PGK*

25 (TGY186). Dans un premier temps, un plasmide pTG10058 contenant la séquence d'ADNc codant pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  bovin décrit par Zuber et al., 1986, flanquée par les sites *SalI* et *MluI* et située en aval du promoteur de levure *CYC1*, a été généré selon le schéma de la figure 11 : Le plasmide

30 pGB17 $\alpha$ -5 décrit dans la demande de brevet WO 89/10963 et contenant la séquence codante pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  bovin a été ouvert par digestion avec l'enzyme de restriction *XhoI* puis traité à la phosphatase alcaline. Après phosphorylation et hybridation, les oligonucléotides ayant les séquences

35 suivantes :

OTG4511 : TCGACGGACGCGTGG (SEQ ID N°15) et

OTG4512 : TCGACCACGCGTCCG (SEQ ID N°16)

ont été introduits dans le site *XhoI* générant le plasmide

pTG10104. Le plasmide pTG10104 a été ensuite traité par les enzymes de restriction *SalI* et *MluI*, puis introduit dans le plasmide pTG10031 décrit par E. Degryse et al., 1995 contenant le promoteur de levure *CYC1*, préalablement digéré  
5 avec les enzymes de restriction *SalI* et *MluI* et traité avec la phosphatase alcaline. Le vecteur pTG10058 contenant l'ADNc codant pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  bovin est ainsi obtenu (figure 12). Le plasmide pTG10058 a été ensuite digéré par les enzymes de restriction *SalI* et *MluI* et traité à la  
10 phosphatase alcaline. Le fragment *SalI-MluI* de 1,7kb contenant la séquence codante pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  bovin a été isolé, puis ligaturé dans le vecteur d'expression pTG10085 décrit par E. Degryse et al., 1995 et contenant le promoteur de levure *TEF1*, préalablement digéré par les  
15 enzymes *SalI* et *MluI*. Le plasmide pTG10293 (figure 13) dans lequel la séquence codante pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  est sous le contrôle du promoteur *TEF1* est ainsi obtenu. Dans un second temps, le plasmide d'expression pTG10435 a été généré par recombinaison homologue entre le plasmide de  
20 recombinaison pTG10434 décrit par E. Degryse et al., 1995 et contenant la séquence ARSH4/CEN6, préalablement digéré par les enzymes *SalI* et *MluI* et le fragment *NotI* de 2,8 kb obtenu à partir du plasmide pTG10293 préparé ci-dessus. Le plasmide pTG10435 ainsi obtenu (figure 14) et contenant la  
25 séquence codant pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  bovin sous le contrôle du promoteur *TEF1*, a été ensuite transformé respectivement dans la souche parente FY1679 ou dans la souche TGY186 (*atf2-Δ::TEF1/PGK*) préparée à l'exemple 4. Les transformants ont été isolés comme indiqué ci-dessus sur  
30 le milieu YNBG (Difco) enrichi en tryptophane, histidine et leucine (100  $\mu$ g/ml de chacun). Les colonies ainsi obtenues ont été ensuite précultivées pendant 16 heures dans le milieu YNB (Difco) contenant 2 % de glucose et 0,5 % de casaminoacides, puis diluées dans du milieu frais à  $A_{600} =$   
35 0,2. Après 6 heures de croissance, 100  $\mu$ /ml de prégnénolone ou de progestérone ont été ajoutés. Après 48 heures de croissance et de bioconversion à 28°C, les stéroïdes ont été extraits et mesurés par RP-HPLC comme indiqué à l'exemple 1

en utilisant respectivement des standards de prégnénolone et de 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone ou de progestérone et de 17 $\alpha$ -hydroxypro-gestérone.

Les résultats obtenus exprimés en  $\mu\text{g/ml}$  sont montrés dans le  
5 tableau 4 suivant :

Tableau 4

Souche	FY1679/pTG10435	TGY186/pTG10435
Substrat : Prégnénolone		
Prégnénolone	0	67,1
17 $\alpha$ -Hydroxyprégnénolone	0	42,0
Substrat : Progestérone		
Progestérone	46,5	41,4
17 $\alpha$ -Hydroxyprogestérone	29,3	33,1

10 Ces résultats montrent que la capacité de bioconversion du cytochrome P<sub>450</sub>17 $\alpha$  exprimé à partir du vecteur pTG10435 est à peu près la même dans la souche sauvage (FY) ou dans son mutant *atf2* (TGY186) avec la progestérone comme substrat.

D'autre part, avec la prégnénolone comme substrat, la même  
15 bioconversion est obtenue comparativement à la progestérone mais seulement avec le mutant *atf2* (TGY186). Dans la souche sauvage FY, à la fois le substrat et le produit sont acétylés et on ne détecte pas d'hydroxyprogestérone libre.

Un échantillon de la souche transformée TGY186/pTG10435 a été  
20 déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) INSTITUT PASTEUR, 25, Rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE, le 20 janvier 1999 sous le numéro I-2119.

**Exemple 6 : Construction d'une souche de levure ayant le gène**  
25 **ATF2** interrompu par *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* et coexprimant la 3 $\beta$ -HSD et P<sub>450</sub>17 $\alpha$ .

Le plasmide pTG10417 (figure 21) contenant le réplicon de levure 2 $\mu$  et deux blocs d'expression, l'un codant pour la 3 $\beta$ -HSD humaine, l'autre codant pour le cytochrome P<sub>450</sub>17 $\alpha$  bovin,

tous les deux sous le contrôle du promoteur *CYC1* de *S. cerevisiae* et portant le marqueur de sélection *URA3-d* a été construit en suivant successivement les stades 1 à 3 décrits ci-dessous (figures 15A et B), puis les stades 4 à 6 décrits ci-dessous, puis transformé dans une souche de levure mutante *atf2-Δ::TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>* (TGY186).

Stade 1 : construction du plasmide pTG10210

Le vecteur d'expression pTG10033 décrit par E. Degryse et al., 1995 et contenant le promoteur hybride de levure *GAL10/CYC1*, préalablement digéré par l'enzyme de restriction *PvuII*, a été traité par la phosphatase alcaline puis religaturé en présence de l'oligonucléotide ayant la séquence suivante :

OTG1050 : CCCGAATTCGGG (SEQ ID N°17)

15 préalablement phosphorylé et hybridé sur lui-même de façon à introduire des sites *EcoRI* en bordure du bloc d'expression contenant le promoteur *GAL10/CYC1*. Le vecteur pTG10210 est ainsi obtenu.

Stade 2 : construction du plasmide pTG10214

20 Le bloc d'expression contenant le promoteur *GAL10/CYC1* présent dans le vecteur pTG10210 a été ensuite introduit dans le vecteur navette *E. coli*-levure pTG10013 décrit par E. Degryse et al., 1995 et contenant le marqueur de sélection *URA3-d*.

25 Le vecteur pTG10013, après digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* et traitement à la phosphatase alcaline, a été ligaturé dans le vecteur pTG10210 préparé au stade 1, préalablement digéré avec l'enzyme *EcoRI*. Le vecteur pTG10214 ainsi obtenu contient le bloc d'expression contenant le

30 promoteur *GAL10/CYC1* dirigé vers le réplicon 2μ.

Stade 3 : construction du plasmide pTG10274

Dans le plasmide pTG10214, le promoteur *GAL10/CYC1* a été ensuite échangé avec le promoteur *CYC1* par recombinaison homologue après excision du plasmide par traitement avec les

35 enzymes de restriction *ClaI* et *SalI*. Le vecteur d'expression pTG10031 décrit par E. Degryse et al., 1995 et contenant le promoteur *CYC1* a été digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *FspI*, puis recombiné avec le plasmide pTG10214



préparé au stade 2 et préalablement digéré avec les enzymes de restriction *ClaI* et *SalI*, générant ainsi le plasmide pTG10274 (figure 16).

Stade 4 : construction du plasmide pTG10401

- 5 A partir du plasmide pTG10274 contenant le promoteur *CYC1* et du plasmide pTG10293 contenant la séquence codante pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  sous le contrôle du promoteur *TEF1*, un nouveau plasmide pTG10401 contenant la séquence codante pour le cytochrome  $P_{450}17\alpha$  sous le contrôle du promoteur *TEF1* a été  
10 ensuite généré par recombinaison homologue.

Le promoteur *CYC1* et une partie du réplicon d'*E. coli* ont été excisés du plasmide pTG10274, préparé au stade 3, par digestion avec les enzymes de restriction *MluI* et *DraI*. Le plasmide pTG10293, préparé à l'exemple 5, a été digéré avec  
15 les enzymes de restriction *HindIII* et *PvuII*, puis recombiné avec le plasmide pTG10274 digéré avec les enzymes de restriction *MluI* et *DraI* générant le plasmide pTG10401 (figure 17).

Stade 5 : construction du plasmide pTG10403

- 20 L'ADNc codant pour la  $3\beta$ -HSD humaine de type II a été ensuite introduit dans le plasmide pTG10401 sous le contrôle du promoteur *CYC1*.

Dans un premier temps, le vecteur d'expression pTG10262 contenant l'ADNc codant pour la  $3\beta$ -HSD humaine de type II, a  
25 été construit selon le schéma de la figure 18, à partir du vecteur de transfert pTG10095 préparé à l'exemple 3 et du vecteur de recombinaison pTG10257 contenant le réplicon de levure  $2\mu$ , un réplicon d'*E. coli*, la cassette d'expression de levure  $CYC1_{prom}-PGK_{term}$  et un marqueur de sélection *URA3-d*. Ce  
30 vecteur pTG10257 est identique au vecteur de recombinaison pTG10042 décrit par E. Degryse et al., 1995, à l'exception du site *XbaI* contenu dans la région  $2\mu$  et qui est remplacé par un marqueur *XbaI*<sup>o</sup> obtenu par remplissage du site *XbaI* naturel avec le fragment de Klenow puis religature.

- 35 Le bloc d'expression de la  $3\beta$ -HSD humaine de type II a été excisé du vecteur de transfert pTG10095 par digestion avec l'enzyme de restriction *NotI*, puis introduit dans le vecteur de recombinaison pTG10257 préalablement digéré avec les

enzymes de restriction *SalI* et *MluI*, générant le vecteur d'expression pTG10262 (figure 19). Il faut noter que la recombinaison du bloc *GAL10/CYC1-ADNc* provenant du plasmide pTG10095 dans le vecteur de recombinaison pTG10257 contenant  
5 le promoteur *CYC1* produit un vecteur d'expression contenant le bloc *CYC1-ADNc*.

Dans un deuxième temps, le vecteur d'expression pTG10262, préparé ci-dessus, a été digéré avec l'enzyme de restriction *XmnI*. Le fragment obtenu contenant l'ADNC codant pour la 3 $\beta$ -  
10 HSD a été recombiné avec le fragment du plasmide pTG10401 préparé au stade 4 contenant l'ADNC codant pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  obtenu par digestion avec l'enzyme de restriction *SalI*. Le plasmide pTG10403 (figure 20) ainsi obtenu contient deux blocs d'expression, l'un codant pour la 3 $\beta$ -HSDH sous le  
15 contrôle du promoteur *CYC1*, l'autre codant pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  sous le contrôle du promoteur *TEF1*.

Stade 6 : construction du plasmide pTG10417

Enfin, dans le plasmide pTG10403 ci-dessus, le promoteur *TEF1* a été échangé avec le promoteur *CYC1*.  
20 D'une part, le plasmide pTG10058 décrit à l'exemple 5 a été digéré avec l'enzyme de restriction *PvuII*, ce qui permet de libérer une partie de la séquence codante pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  associée avec le promoteur *CYC1* ainsi que la majeure partie du réplicon d'*E. coli*. D'autre part, une partie du  
25 réplicon d'*E. coli* a été éliminée du plasmide pTG10403 préparé au stade 5 par digestion avec l'enzyme de restriction *DraI*. Par recombinaison des deux plasmides préalablement ainsi digérés, le plasmide pTG10417 est finalement obtenu. Le plasmide pTG10417 contient le réplicon de levure 2 $\mu$ , le  
30 marqueur de sélection *URA3-d* et les deux blocs d'expression, l'un codant pour la 3 $\beta$ -HSD humaine, l'autre codant pour le cytochrome *P<sub>450</sub>17 $\alpha$*  d'origine bovine, tous les deux sous le contrôle du promoteur de levure *CYC1* (Figure 21).

Le plasmide pTG10417 a été ensuite transformé respectivement  
35 dans la souche parente FY1679 ou dans la souche TGY186 (*atf2- $\Delta$ ::TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*) préparée à l'exemple 4.

Les transformants ont été isolés sur un milieu YNB (Difco) gélosé, contenant 0,5 % de glucose, enrichi en tryptophane,

histidine et leucine (100 µg/ml chacun).

Les colonies ainsi obtenues ont été ensuite précultivées pendant 24 heures à 28°C dans le milieu YNB (Difco) contenant 0,5 % de glucose et 0,1 % de casaminoacides, puis diluées à

5 A600=0,1 et supplémentées en prégnénolone à 100 µg/ml, soit dans le même milieu frais (milieu 1), soit dans le milieu YNB (Difco) contenant 0,1 % de glucose, 2 % de glycérol et 0,2 % de casaminoacides (milieu 2). Après 48 heures de croissance et de bioconversion, les stéroïdes ont été extraits et  
10 mesurés par RP-HPLC comme indiqué à l'exemple 1 en utilisant les standards de prégnénolone, 17α-hydroxyprégnénolone, progestérone et 17α-hydroxyprogestérone.

Les résultats obtenus exprimés en µg/ml sont montrés dans le tableau 5 (milieu 1) et le tableau 6 (milieu 2) suivants :

15

Tableau 5

Souche	FY1679/pTG10417	TGY186/pTG10417
Prégnénolone	0	58,1
Prégnénolone acétate	87,3	0
17α-hydroxyprégnénolone	0	3,1
17α-hydroxyprégnénolone acétate	0	0
Progestérone	10,6	1,4
17α-hydroxyprogestérone	1,3	23,4

Tableau 6

20

Souche	FY1679/pTG10417	TGY186/pTG10417
Prégnénolone	0	54,0
Prégnénolone acétate	52,1	0
17α-hydroxyprégnénolone	0	3,4
17α-hydroxyprégnénolone acétate	12,8	0
Progestérone	0	1,4
17α-hydroxyprogestérone	8,6	31,4

Ces résultats montrent que la bioconversion dans la souche sauvage (FY) transformée par le plasmide pTG10417 résulte dans l'accumulation de prégnénolone acétate et de 17 $\alpha$ -hydroxyprégnénolone acétate qui ne sont pas transformés

5 ultérieurement par les enzymes 3 $\beta$ -HSDH ou P<sub>450</sub>17 $\alpha$  et que le bilan de bioconversion est inférieur à celui observé avec le mutant *atf2* (TGY186) transformé.

Un échantillon de la souche transformée TGY186/pTG10417 a été déposé à la Collection Nationale de Cultures de Micro-

10 organismes (CNCM) INSTITUT PASTEUR, 25, Rue du Docteur Roux 75724 PARIS CEDEX 15 FRANCE, le 20 janvier 1999 sous le numéro I-2118.

#### Références bibliographiques

- Achstetter T., Nguyen-Juilleret M., Findeli A., Merkamm M.

15 and Lemoine Y. (1992), *Gene* **110**, 25-31.

- Amberg D.C., Botstein D. and Beasley E.M., (1995), *Yeast* **11** : 1275-1280.

- Boeke Jef D., Lacroute F. and Fink G R., (1984) *Mol Gen Genet* **197** : 345-346.

20 - Cauet G., Dumas B., Degryse E., Spagnoli R. and Achstetter T. (1994) in *Cytochrome P-450 biochemistry, biophysics and molecular biology* (Lechner M.C., ed.) pp. 583-586, John Libbey Eurotext.

- Cherry J.M., Adler C., Ball C., Dwight S., Chervitz S., Jia  
25 Y., Juvik G., Roe T., Weng S. and Botstein D., "*Saccharomyces* Genome Database" <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

- Degryse E., *J. Biotech.* **39** (1995) 181-187.

- Degryse E., Dumas B., Dietrich M., Laruelle L. and

30 Achstetter T. (1995). *Yeast* **11** : 629-640.

- Degryse E. (1996), *Gene* **170**, 45-50.

- Dumas B., Cauet G., Degryse E., Spagnoli R. & Achstetter T. (1994). *Cytochrome P450.8<sup>th</sup> International Conference*. Ed. M. C. Lechner. John Libbey Eurotext, Paris pp. 527-530.

35 - Fiechter A., Fuhrmann G.F. and Käppeli O., (1981). *Adv. Microb. Physiol.* **22**, 123-183.

- Fujii T., Nagasawa N., Iwamatsu A., Bogaki T., Tamai Y. and Hamachi M. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2786-2792.

- Hanahan D., J. Mol. Biol. 166 (1983) 557-580.
- Hubacek J. and Glover S.W., (1970), J. Mol. Biol. 50 : 111-127.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A., 1983, Journal  
5 of Bacteriology, 163-168.
- Rhéaume E., Lachance Y., Zhao H.-F., Breton N., Dumont M.,  
de Launoit Y., Trudel C., Luu-The V., Simard J. & Labrie F.  
(1991). Mol. Endocrinol. 5, 1147-1157.
- Rose M., Grisafi P. and Botstein D., Gene 29, 113-124  
10 (1984).
- Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C. and Ferrara P.  
(1992) Anal. Biochem. 203, 173-179.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., (1989).  
Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor  
15 University Press, 2nd edition, Cold Spring Harbor.
- Sherman F. (1991) Methods in Enzymology 194, 3-21.
- Simard J., Durocher F., Mébarki F., Turgeon C., Sanchez R.,  
Labrie Y., Couet J., Trudel C., Rhéaume E., Morel Y., Luu-The  
V. And Labrie F. (1996) J. Endocrinol. 150, 5189-5207
- 20 - Struhl K., Stinchomb DT., Scherer S. and Davis RW., 1979,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 76, N°3, 1035-1039.
- Thierry A., Fairhead C. and Dujon B., Yeast ; Vol. 6 :  
521-534 (1990).
- Zuber MX., Simpson ER. and Waterman MR., (1986a) Science  
25 234, 1258-1261.

## REVENDICATIONS

- 1) Souche de levure modifiée dans laquelle l'activité acétyl-CoA prégnénolone acétyltransférase (APAT) est éliminée par altération du gène codant pour cette activité et dont il  
5 résulte une stabilisation des  $3\beta$ -hydroxystéroïdes.
- 2) Souche de levure modifiée selon la revendication 1 dans laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae* ou un homologue de celui-ci.
- 3) Souche de levure modifiée selon la revendication 2 dans  
10 laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae*.
- 4) Souche de levure modifiée selon la revendication 3 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion d'une séquence d'ADN ayant au moins un nucléotide.
- 5) Souche de levure modifiée selon la revendication 4 dans  
15 laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène de sélection *URA3* ou du bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*.
- 6) Souche de levure modifiée selon la revendication 5 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène de sélection *URA3*.
- 20 7) Souches de *S. cerevisiae* modifiées selon la revendication 6 dénommées TGY156 et TGY158.
- 8) Souche de levure modifiée selon la revendication 5 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*.
- 25 9) Souche de *S. cerevisiae* modifiée selon la revendication 8 dénommée TGY186.
- 10) Souche de levure transformée dans laquelle l'activité acétyl-CoA prégnénolone acétyltransférase (APAT) est éliminée par altération du gène codant pour cette activité et exprimant au moins l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hydrocortisone à partir du cholestérol choisie parmi :  
- l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*P<sub>450</sub>SCC*),  
- la  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -stéroïde déshydrogénase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -  
35 stéroïde isomérase ( $3\beta$ -HSD) et  
- la  $17\alpha$ -stéroïde hydroxylase (*P<sub>450</sub>17 $\alpha$* ).
- 11) Souche de levure transformée selon la revendication 10 dans laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de

*S. cerevisiae* ou un homologue de celui-ci.

12) Souche de levure transformée selon la revendication 11 dans laquelle le gène altéré est le gène *ATF2* de *S. cerevisiae*.

5 13) Souche de levure transformée selon la revendication 12 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion d'une séquence d'ADN ayant au moins un nucléotide.

14) Souche de levure transformée selon la revendication 12 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du gène  
10 de sélection *URA3*.

15) Souche de levure transformée selon la revendication 14 et exprimant la 3 $\beta$ -HSD.

16) Souche de *S. cerevisiae* transformée selon la revendication 15, dénommée TGY158/pTG10862.

15 17) Souche de levure transformée selon la revendication 12 dans laquelle le gène *ATF2* est altéré par insertion du bloc d'expression *TEF1<sub>prom</sub>/PGK<sub>term</sub>*.

18) Souche de levure transformée selon la revendication 17 et exprimant *P<sub>450</sub>17 $\alpha$* .

20 19) Souche de *S. cerevisiae* transformée selon la revendication 18, dénommée TGY186/pTG10435.

20) Souche de levure transformée selon la revendication 17 et coexprimant la 3 $\beta$ -HSD et *P<sub>450</sub>17 $\alpha$* .

21) Souche de *S. cerevisiae* transformée selon la revendication 20, dénommée TGY186/pTG10417.  
25

22) Procédé d'oxydation in vivo d'un substrat choisi parmi un stérol endogène, un stérol exogène ou un stéroïde exogène dans lequel on utilise une souche de levure transformée selon l'une des revendications 10 à 21 que, soit l'on cultive seule  
30 lorsque la souche génère le stérol endogène, soit l'on incube avec le stérol ou le stéroïde exogène et on isole éventuellement le composé oxydé obtenu.

23) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 22 dans lequel le substrat est un 3 $\beta$ -hydroxystéroïde et dans  
35 lequel on utilise une souche de levure transformée selon la revendication 15 et isole éventuellement le 3-oxo-delta<sup>4</sup>-stéroïde obtenu.

24) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 23

dans lequel le  $3\beta$ -hydroxystéroïde est choisi parmi la prégénolone ou la  $17\alpha$ -hydroxyprégénolone.

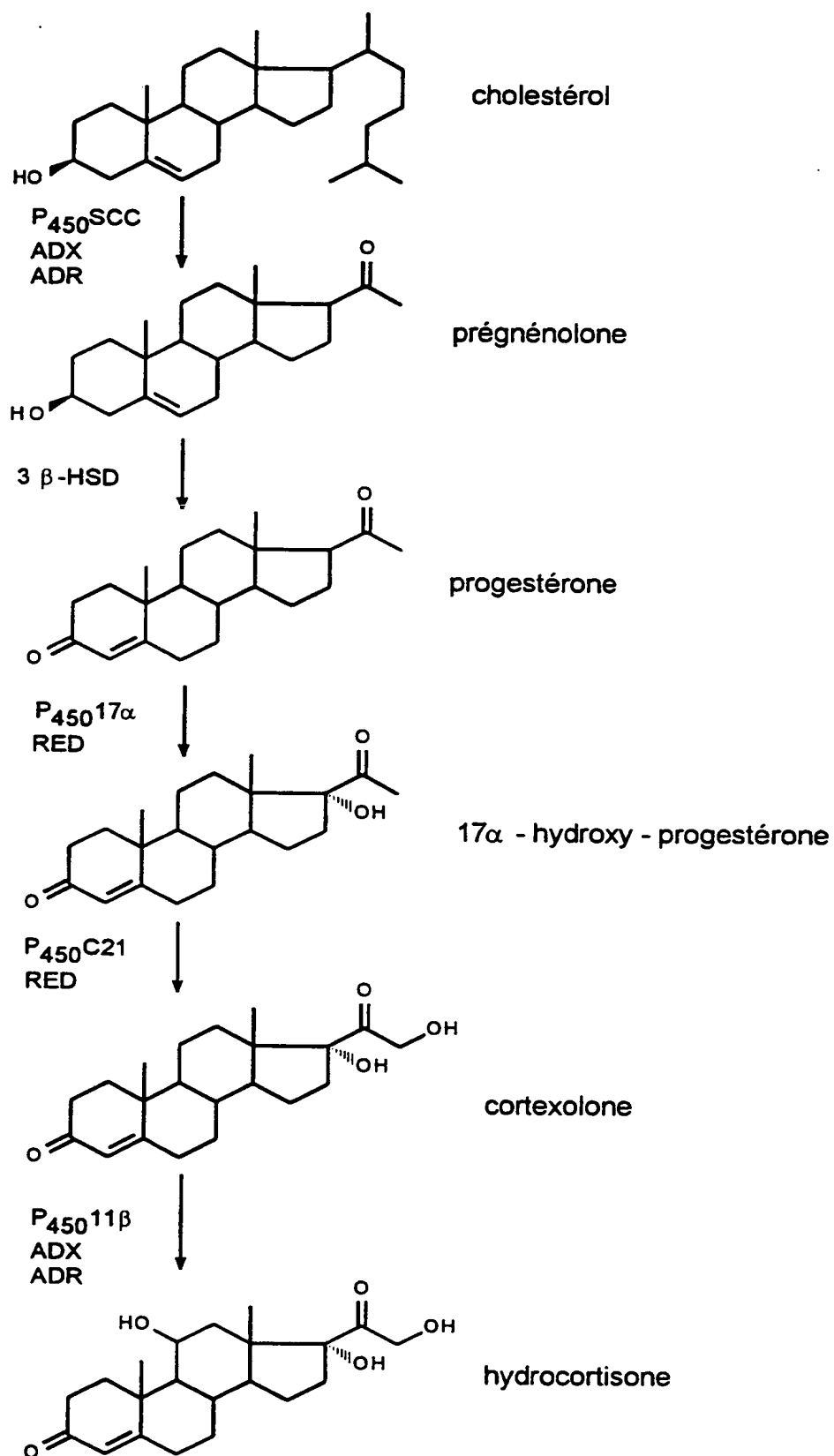
25) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 22 dans lequel le substrat est un stéroïde et dans lequel on  
5 utilise une souche de levure transformée selon la revendication 18 et isole éventuellement le stéroïde  $17\alpha$ -hydroxylé obtenu.

26) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 25 dans lequel le substrat stéroïde est la prégénolone ou la  
10 progestérone.

27) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 22 dans lequel le substrat est un  $3\beta$ -hydroxystéroïde et dans lequel on utilise une souche de levure transformée selon la revendication 20 et isole éventuellement le 3-oxo- $\Delta^4$ -  
15 stéroïde  $17\alpha$ -hydroxylé obtenu.

28) Procédé d'oxydation in vivo selon la revendication 27 dans lequel le substrat stéroïde est la prégénolone.



**FIGURE 1**

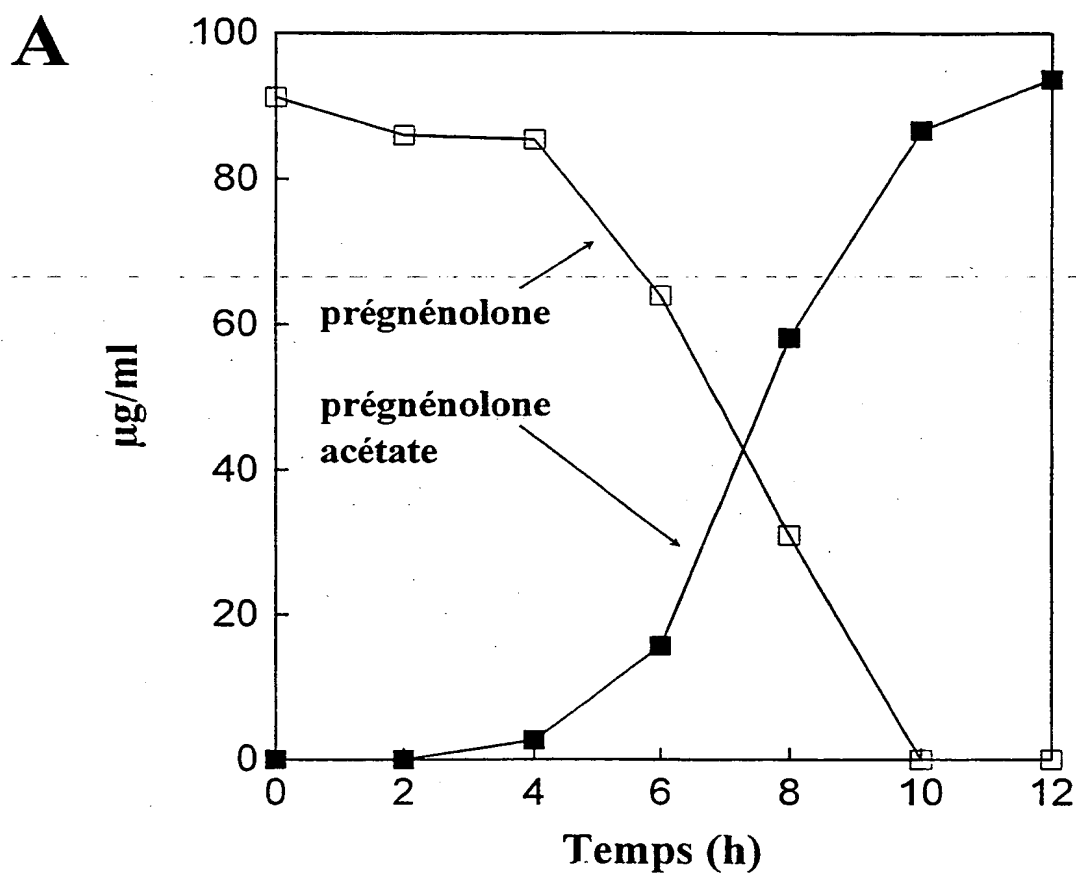


FIGURE 2A

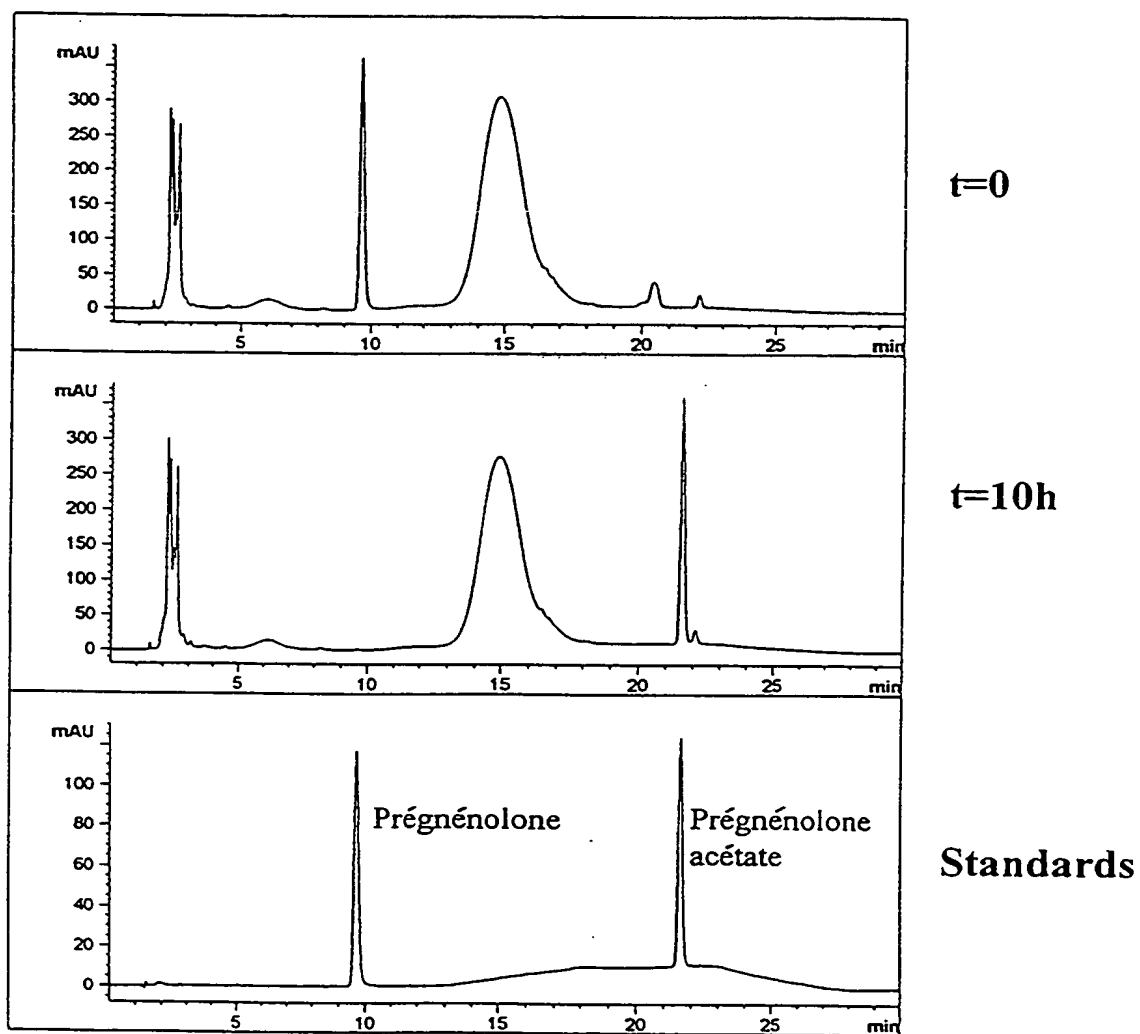
**B**

FIGURE 2B

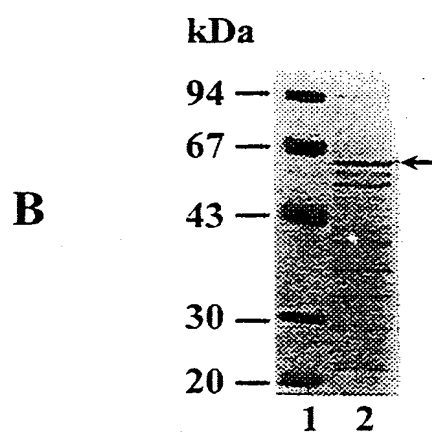
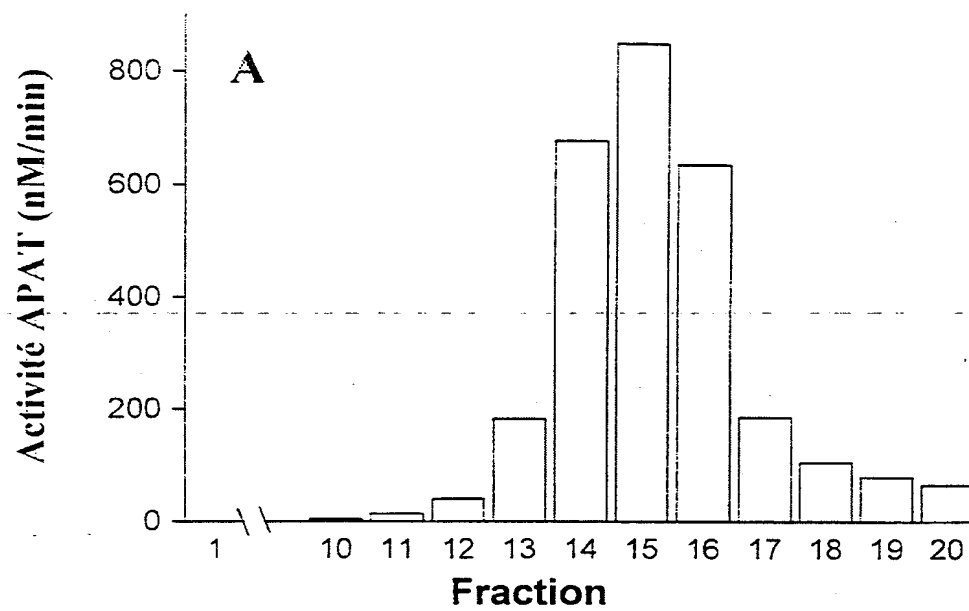


FIGURE 3

30 Y L S S Q S W K K H C R S D Q Q G  
N M S S N I S T C S E L A A S G H S Q  
E L Y N N L E F I Y L Q N I N L F V  
L Q Y M E L F L E I Y I S L D Y I V  
25 G H R A I I G L T F N F P Y Y S L S \*  
M K E L L D A Y T Y P I A Y S N D M L  
R V H D R T L D T S T A Y E A R D S  
R G P F T K K D F N T D S F L Y N F  
20 A K Y E V G F Y F A C F G R S Y M E  
H N H L K P F D K N G G G D D P G G  
G L K H L F L N I P S S D Y V Y I K N I  
R E P S D C L S I L S S H E N Y N T V T  
15 I A I I S D I C S I L S S H E N Y N T V T  
L V T I V K K L I G S V S P V L S Y K T N Q  
E T H I F F W G V D L Y K S Y V E Q S F  
Q F A F Q N D G I P A I T Y S S I V V K  
10 I S T H S E P S D F K T Q F S W F L N C  
H Y S Q I R G E Y L A L D F D G L F  
P M Y P K K C E D T R K R K L T G S  
5 Y Q Q P M G N H D I S I D L D Q N F E  
G R L K V T D D S E R E D V I F F E  
I E S L S E V L V F G I T S V Y D G G I R G  
D L V L R I V V K P K Q L N E L G A L R  
E D V K Y Y I F V K P K A P P G G A D R  
1 M E A L E E V I F N E K P K V L I G G A R  
31 F V L E E V I F N E K P K V L I G G A R  
61 V E E V I F N E K P K V L I G G A R  
91 P E E V I F N E K P K V L I G G A R  
121 P E E V I F N E K P K V L I G G A R  
151 P E E V I F N E K P K V L I G G A R  
181 K I L C N F F R F H Q S T  
211 I L C N F F R F H Q S T  
241 L C N F F R F H Q S T  
271 C N F F R F H Q S T  
301 F F R F H Q S T  
331 F F R F H Q S T  
361 F F R F H Q S T  
391 F F R F H Q S T  
421 F F R F H Q S T  
451 F F R F H Q S T  
481 F F R F H Q S T  
511 F F R F H Q S T

FIGURE 4

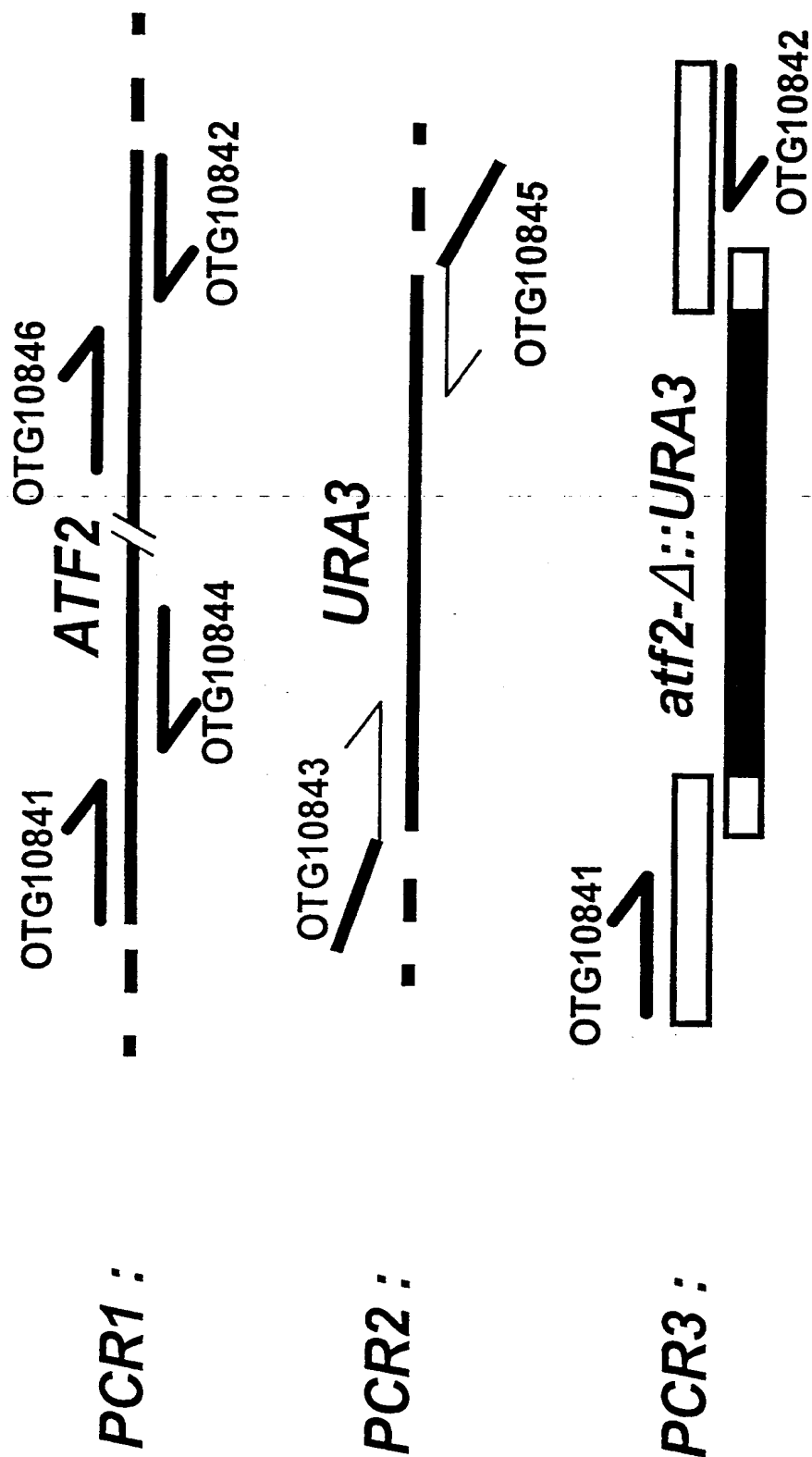


FIGURE 5

7/25

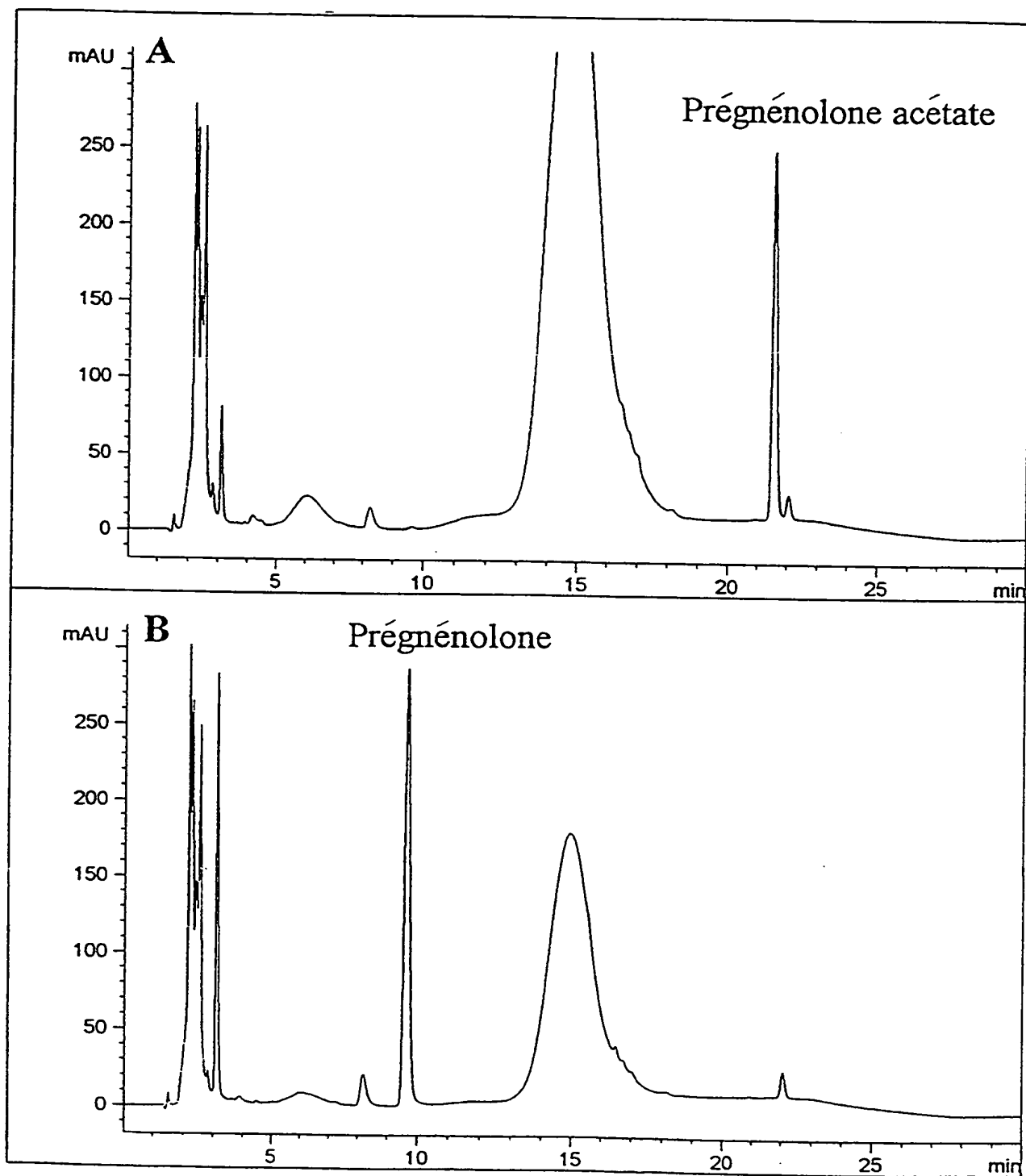


FIGURE 6

8/25

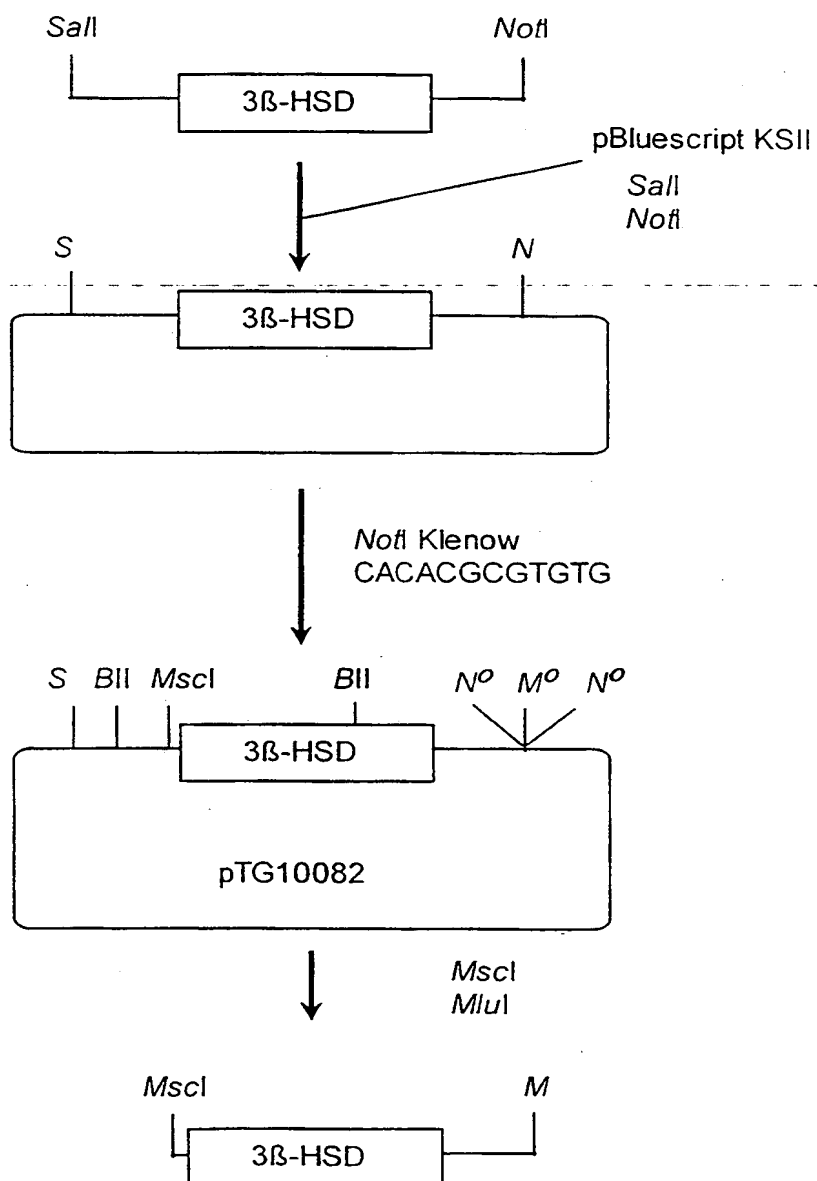


FIGURE 7A



9/25

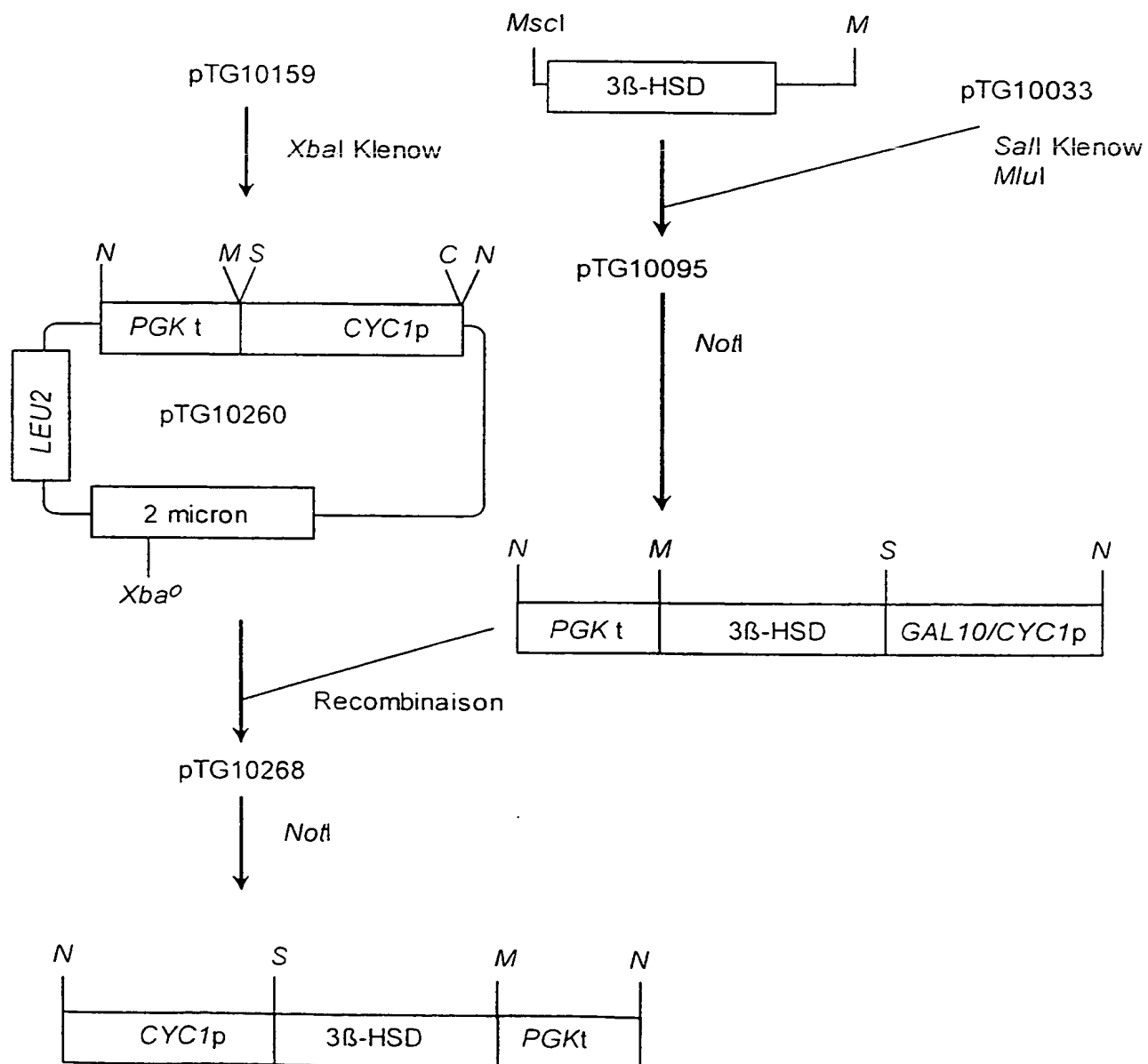


FIGURE 7B

10/25

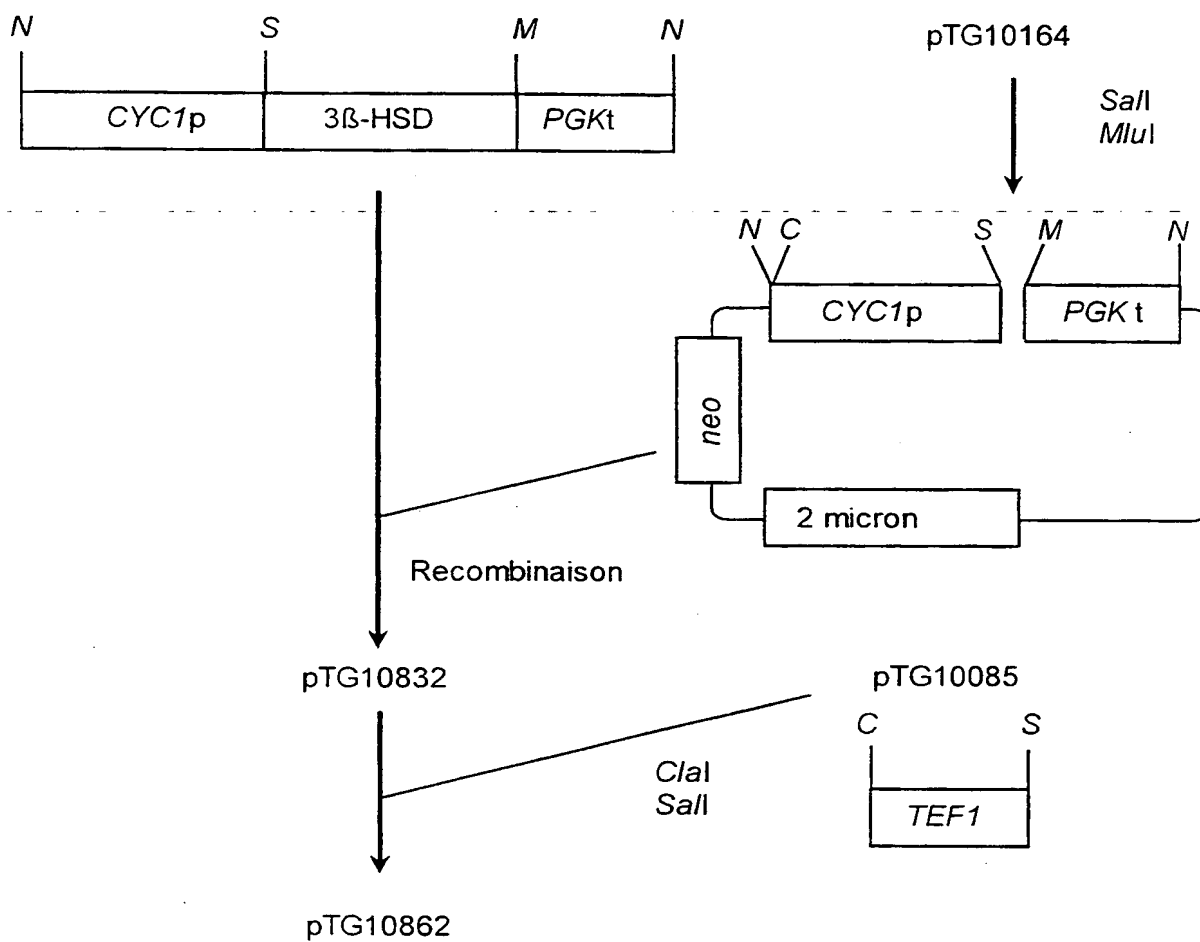


FIGURE 7C

11/25

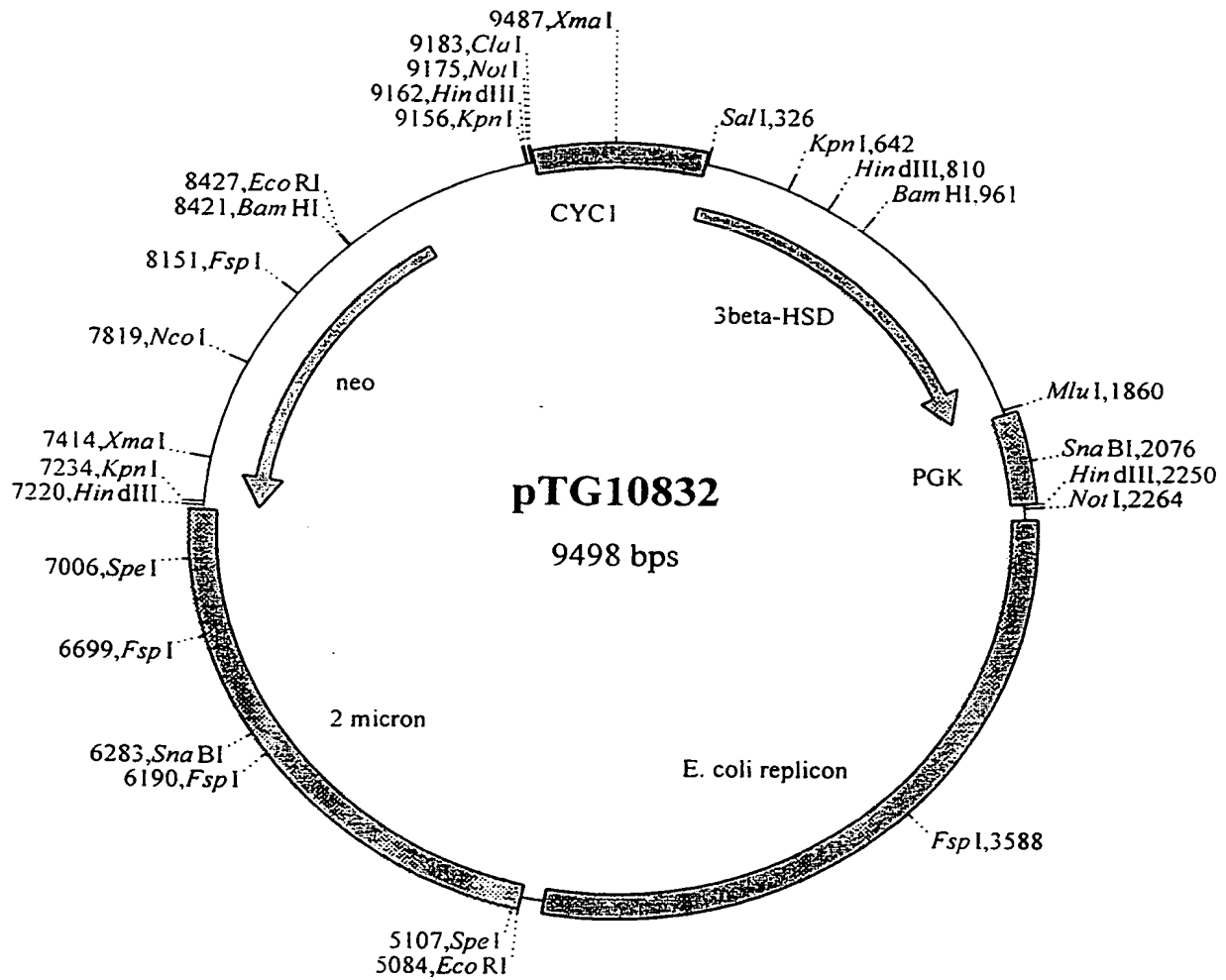


FIGURE 8

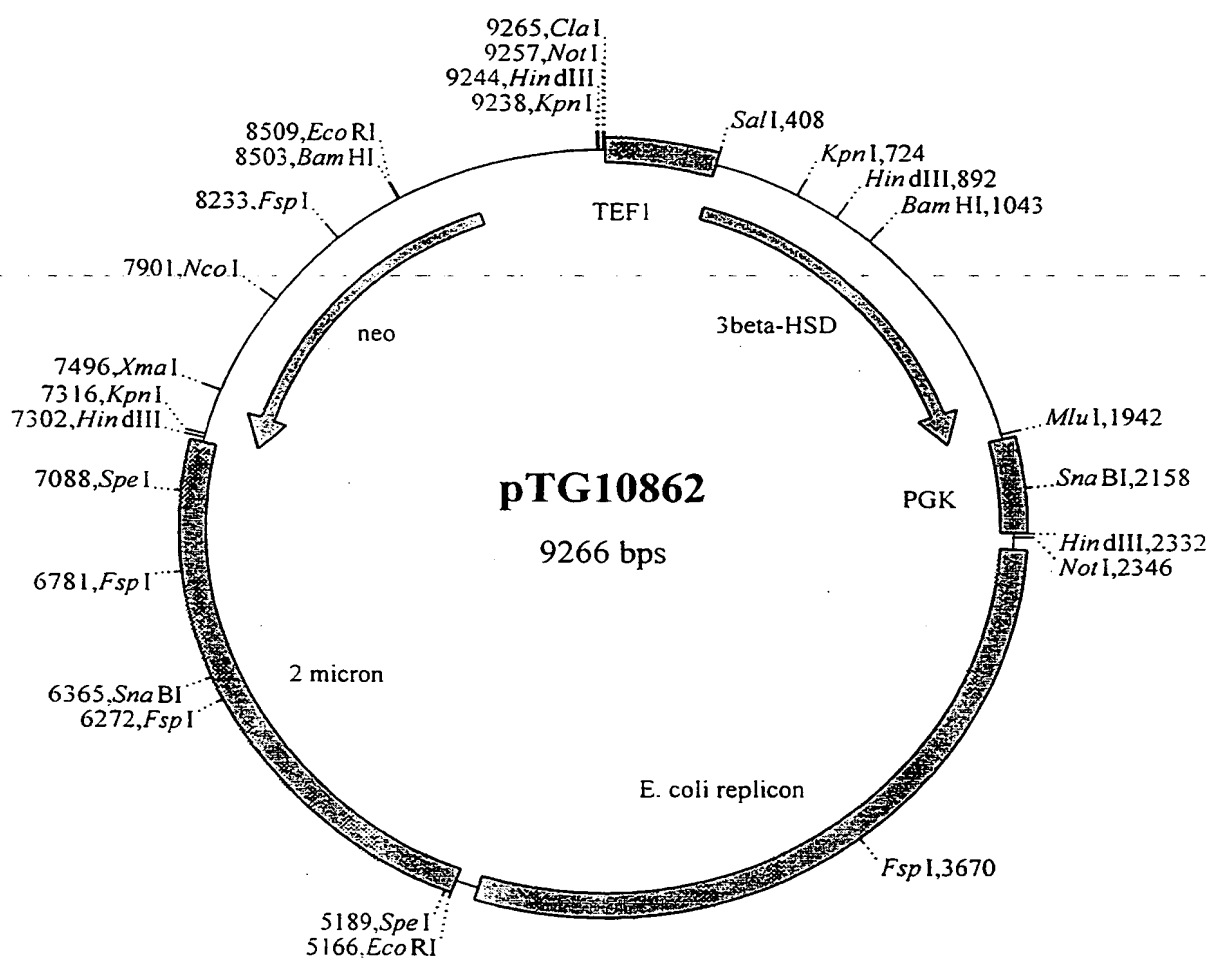


FIGURE 9

13/25

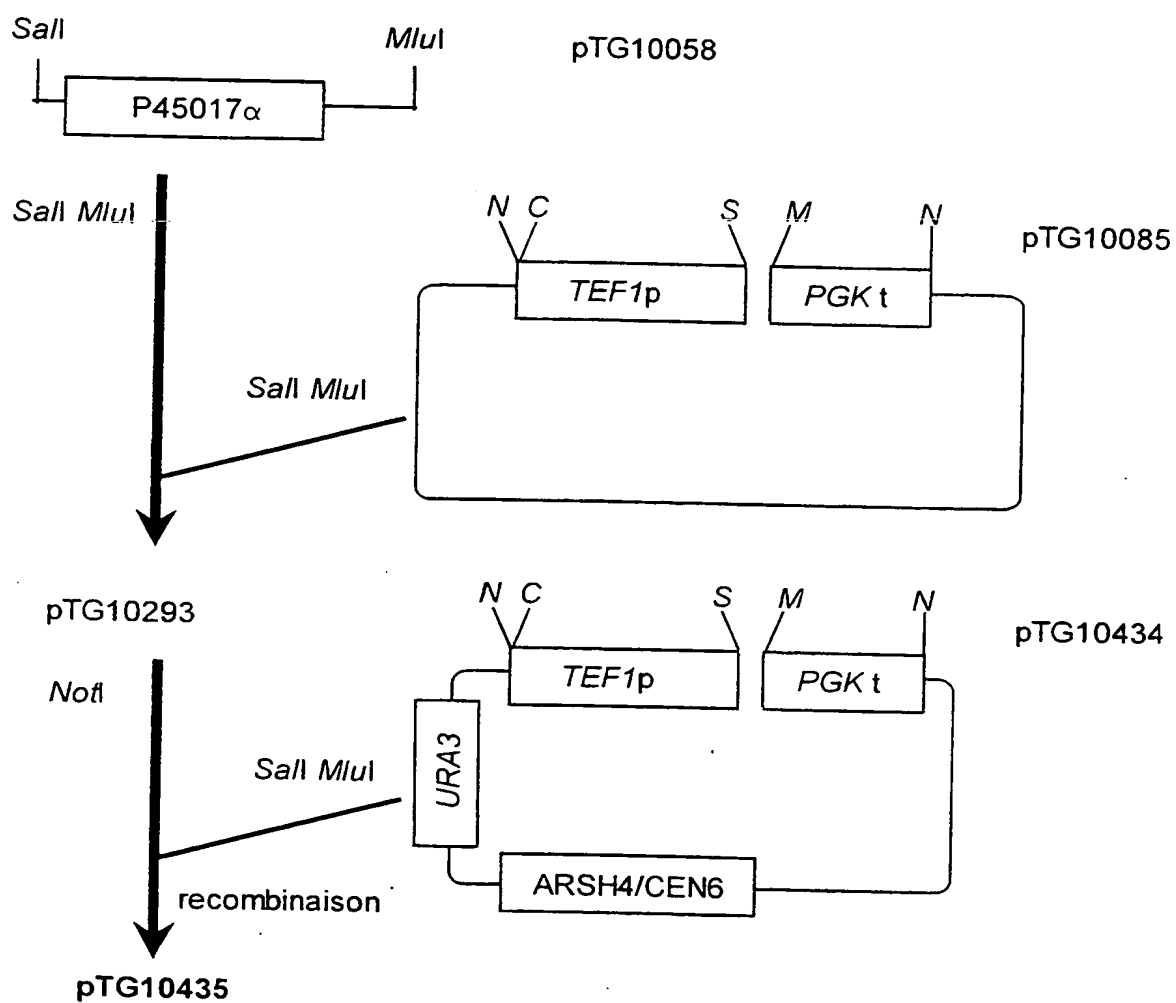


FIGURE 10

14/25

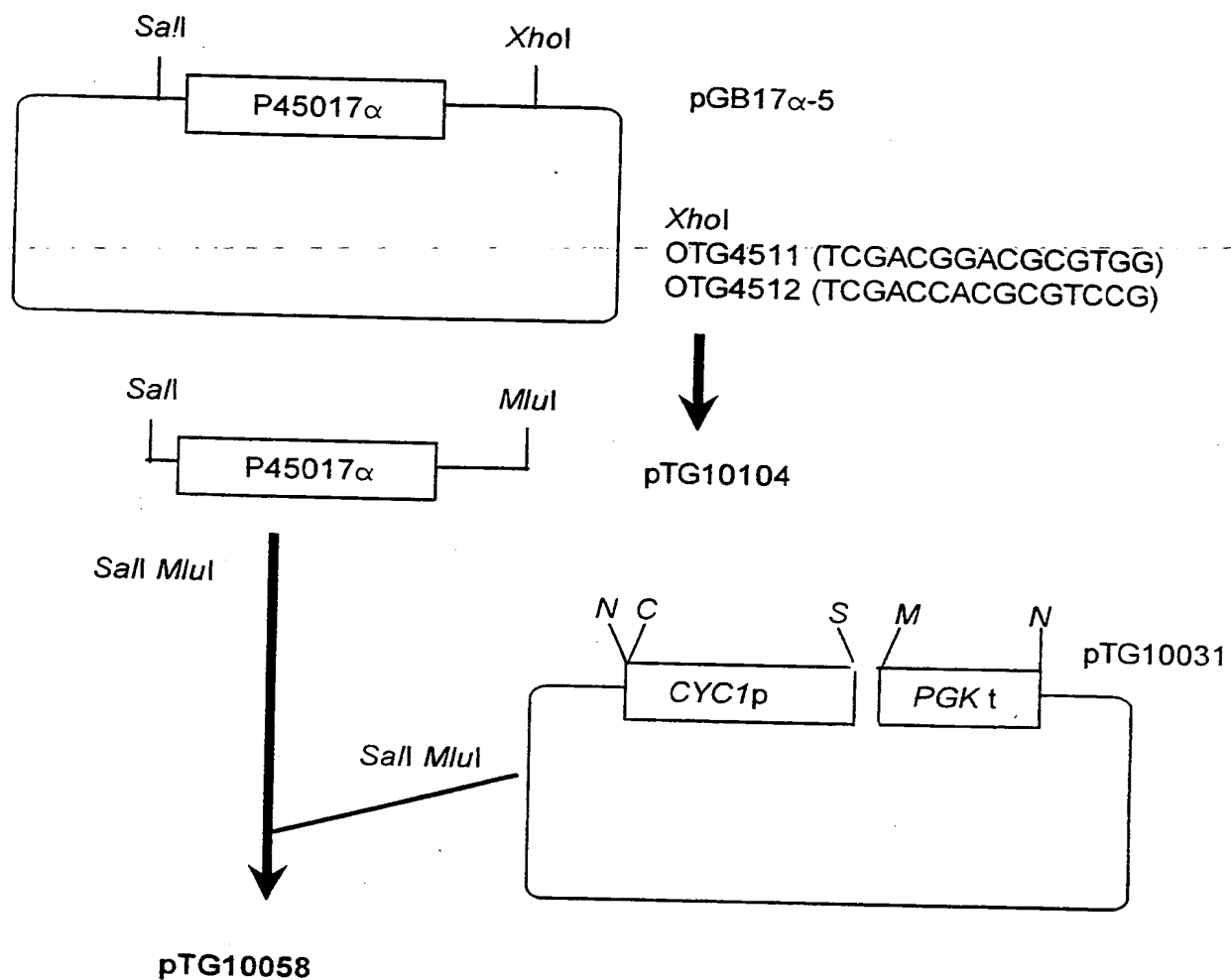


FIGURE 11

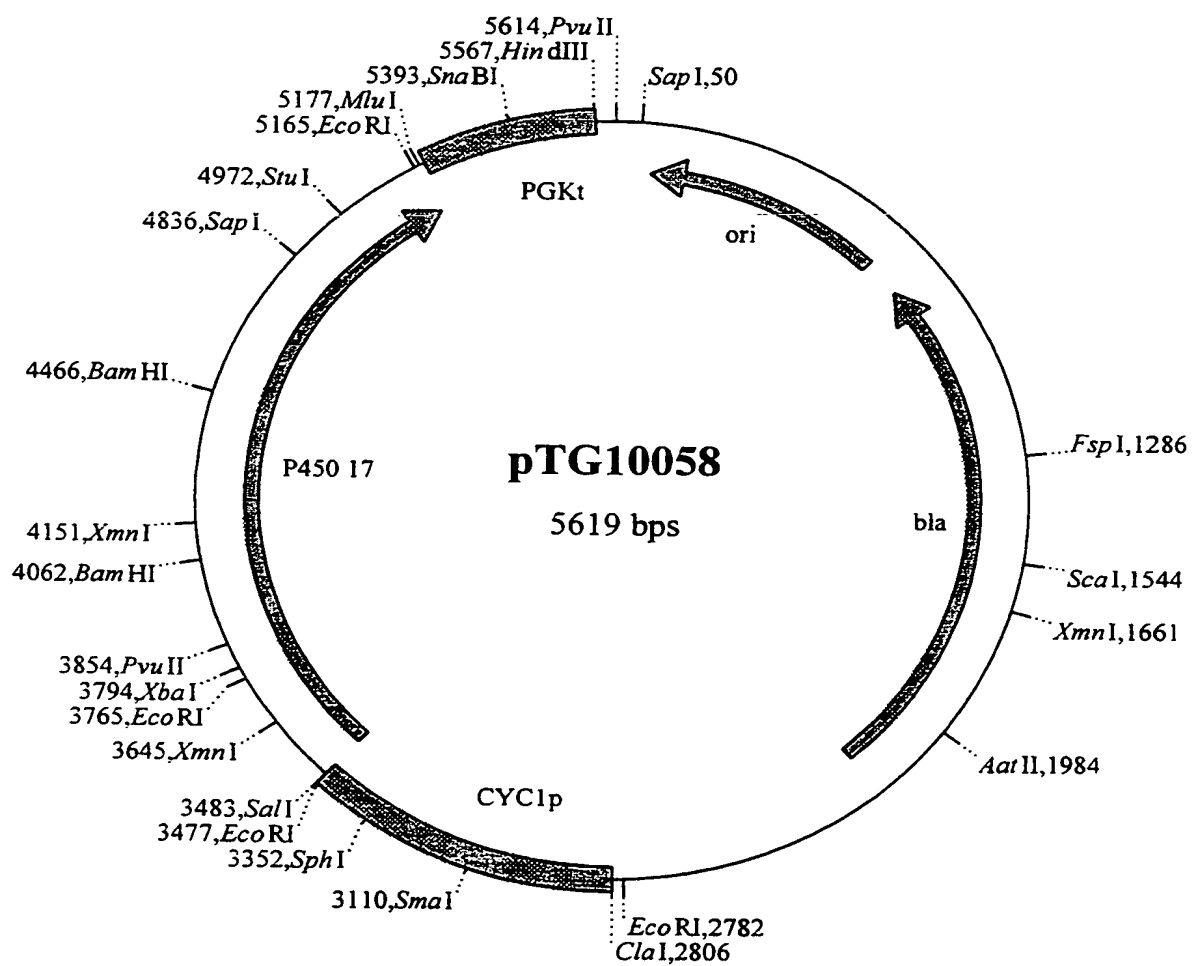


FIGURE 12

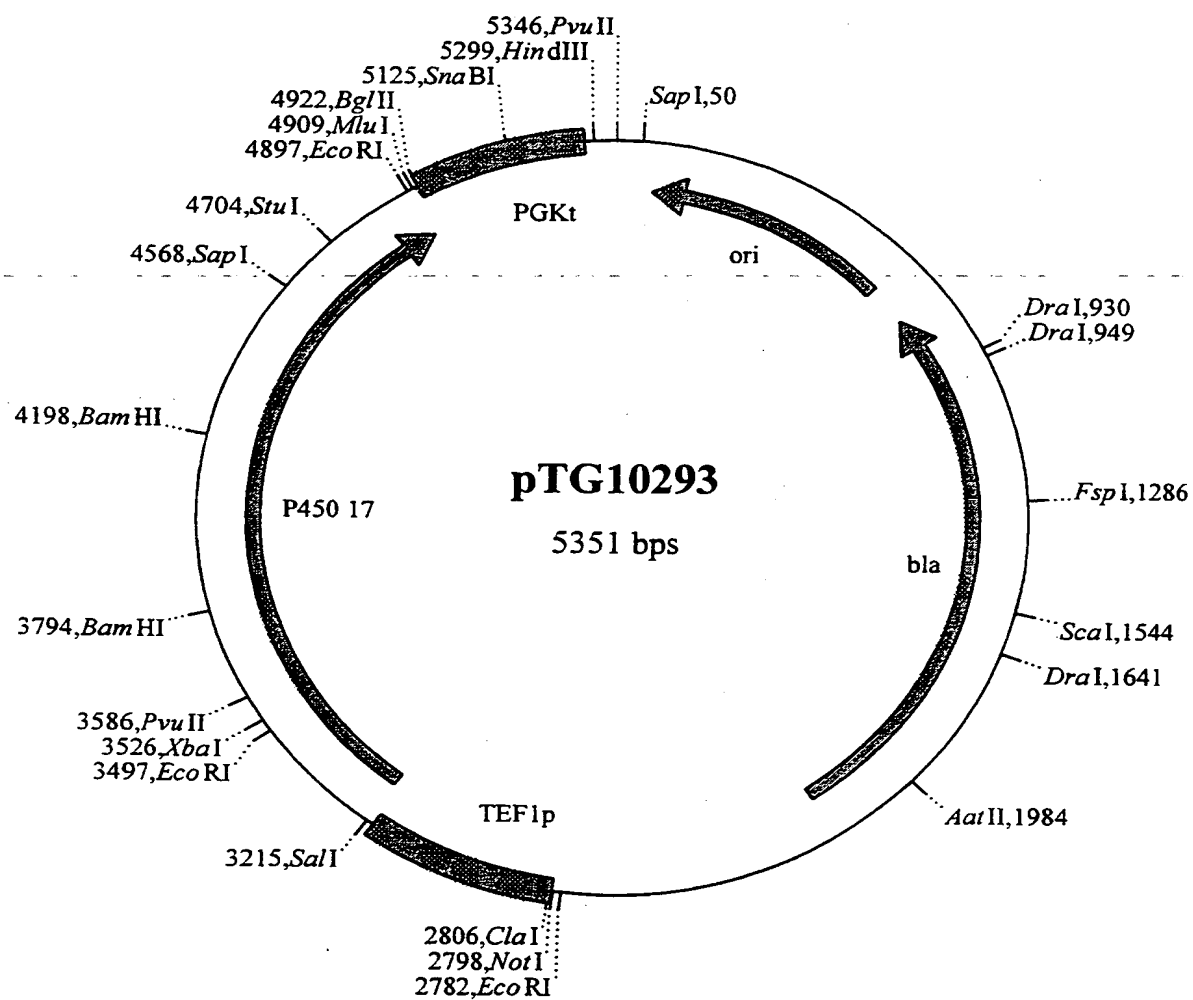


FIGURE 13



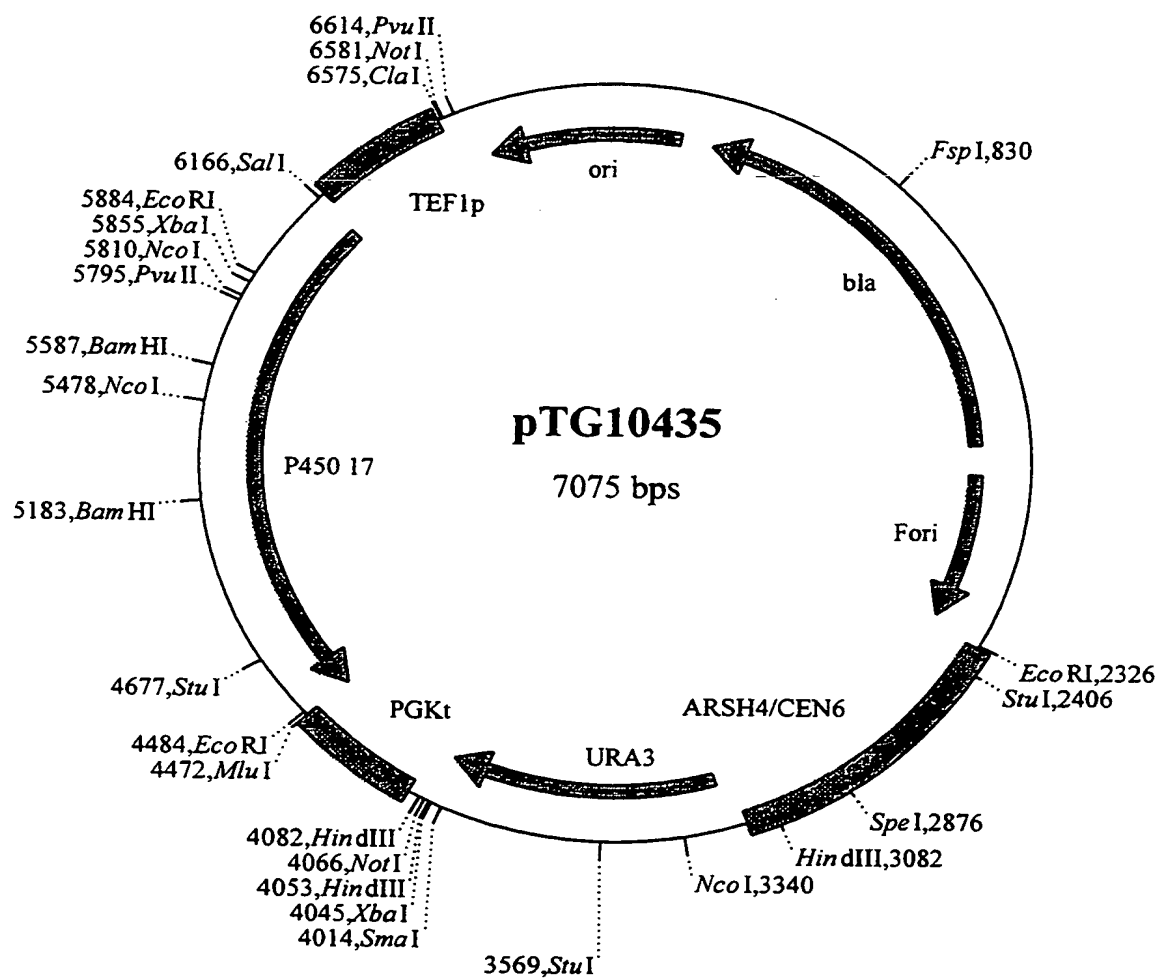


FIGURE 14

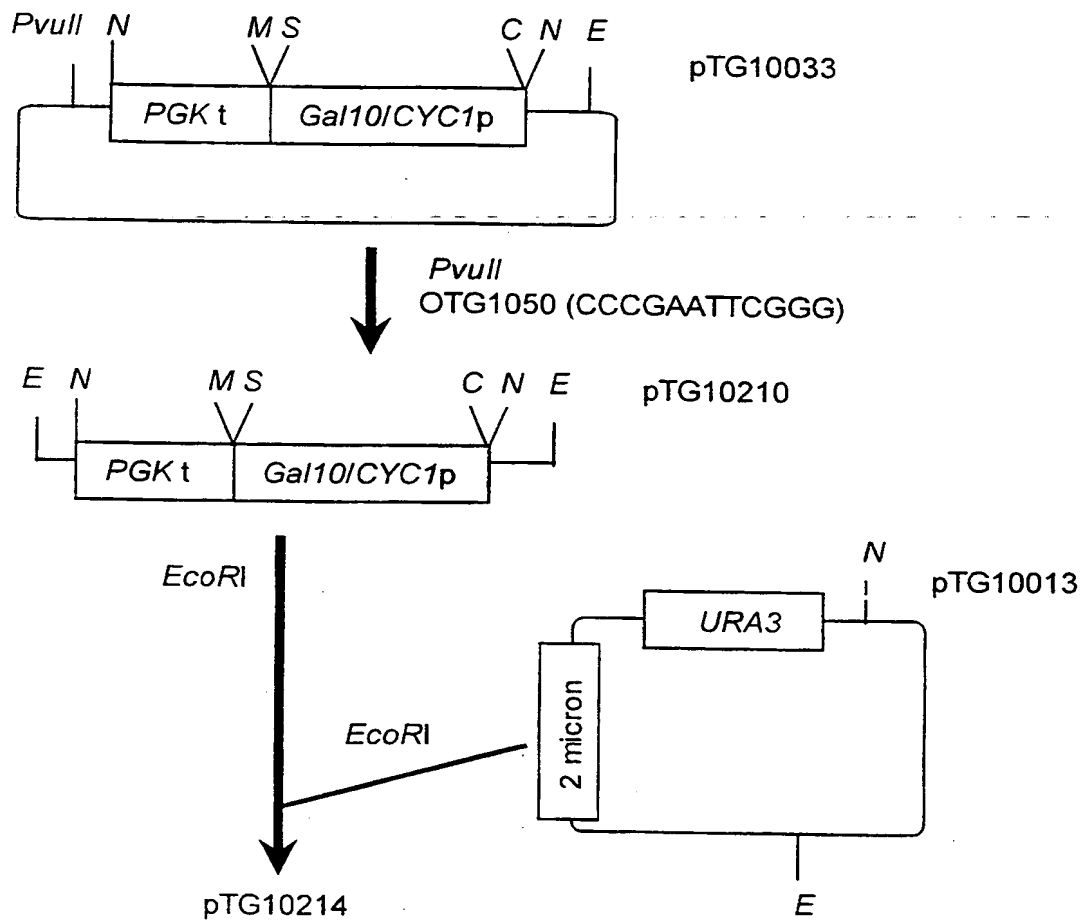


FIGURE 15A

19/25

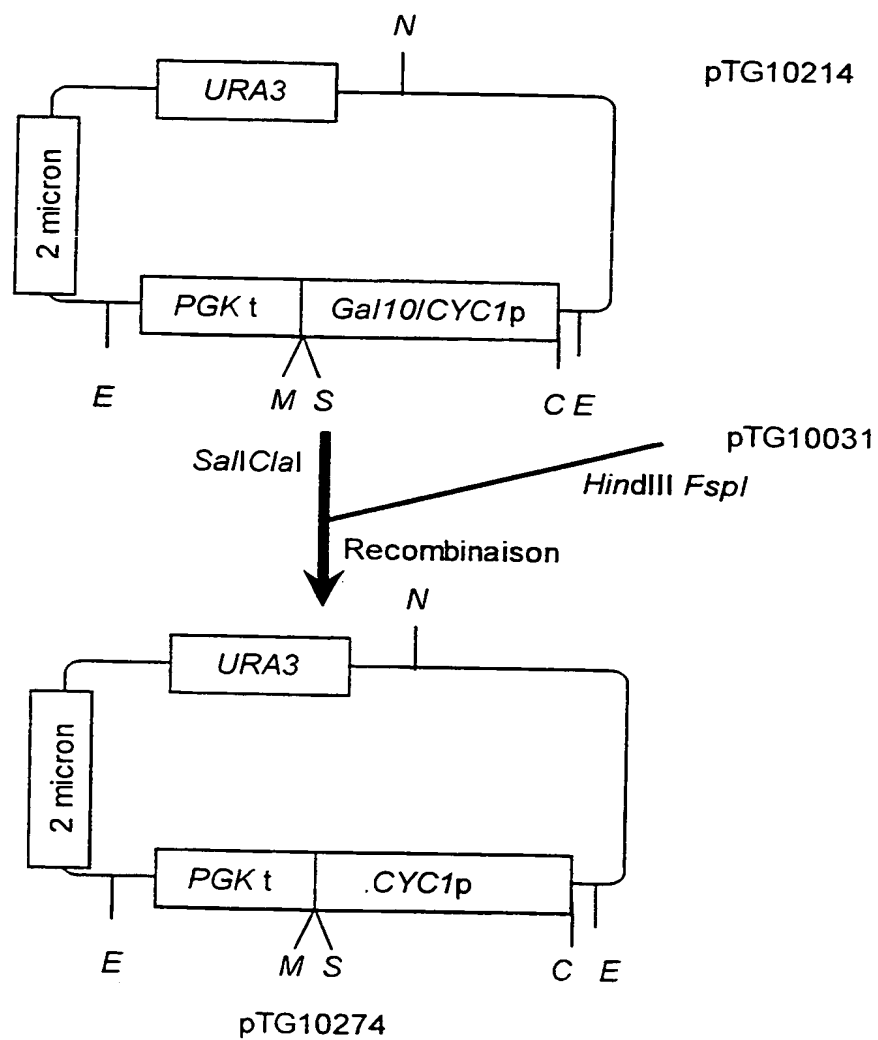


FIGURE 15B

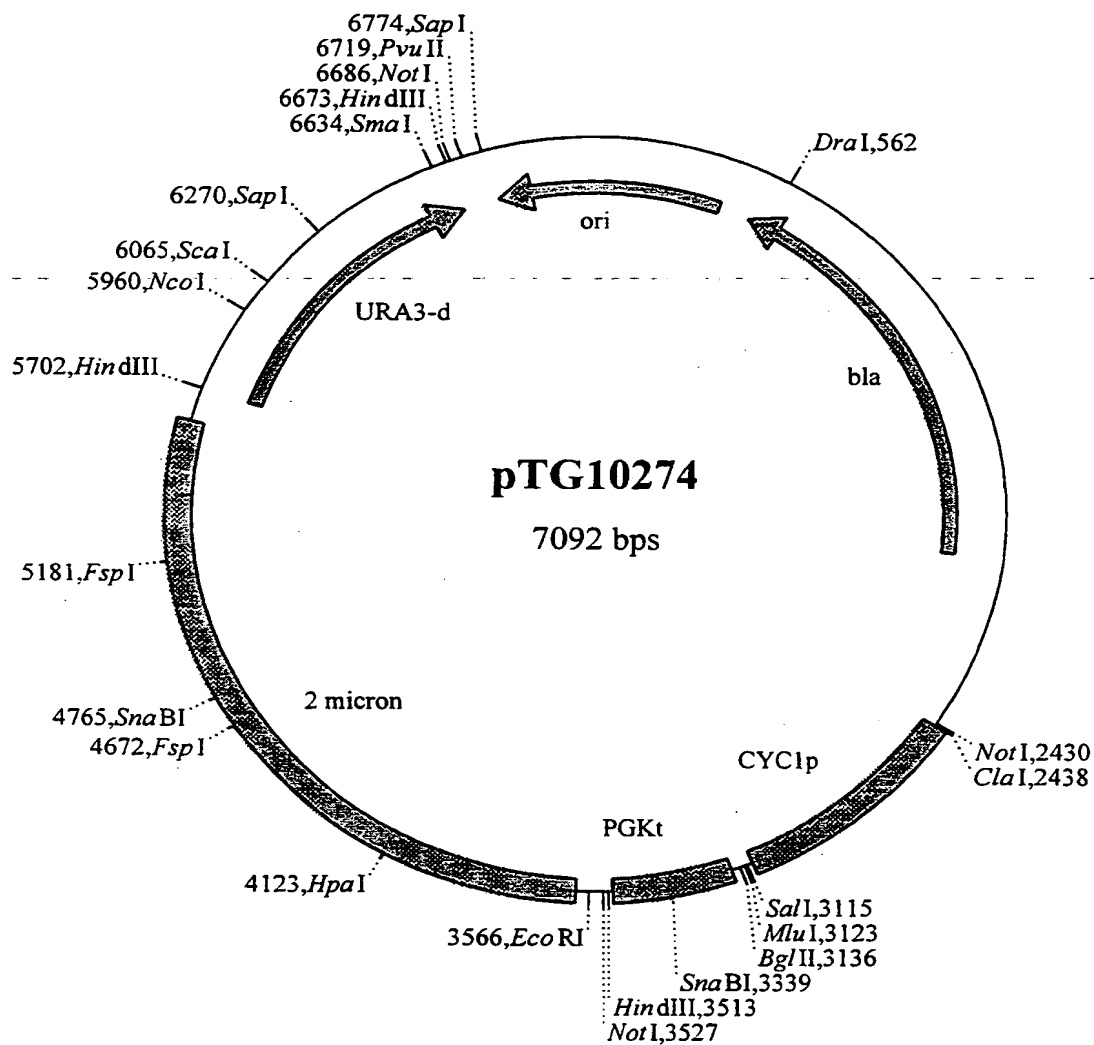


FIGURE 16

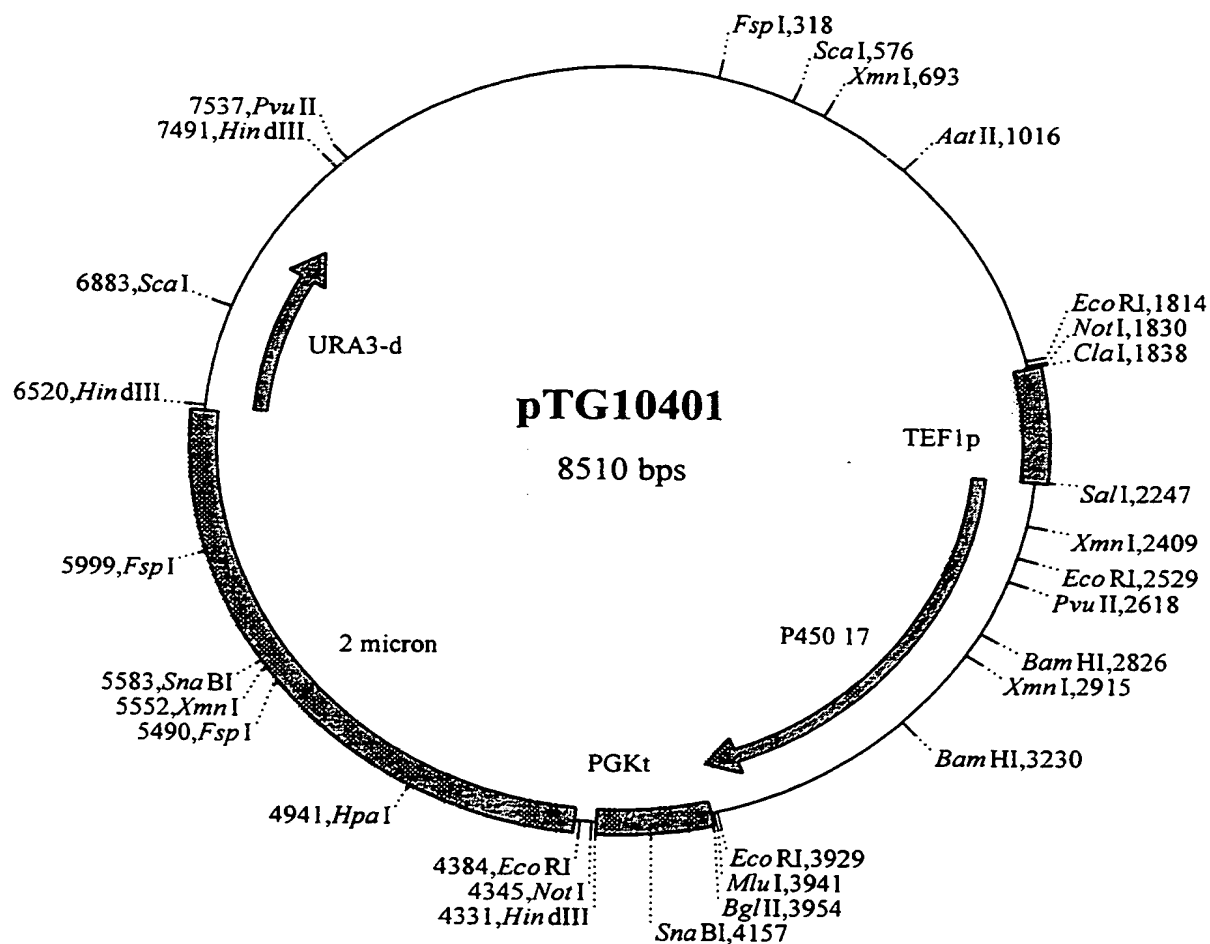


FIGURE 17

22/25

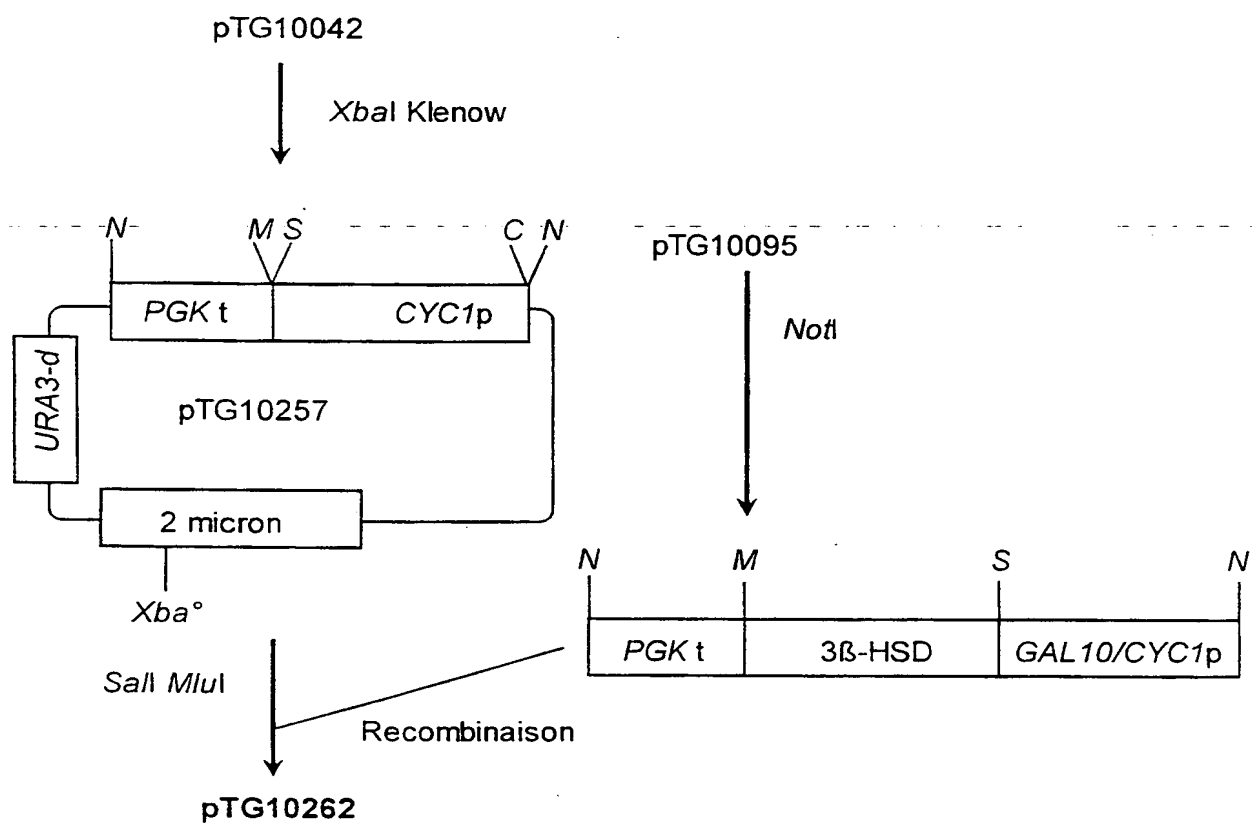


FIGURE 18

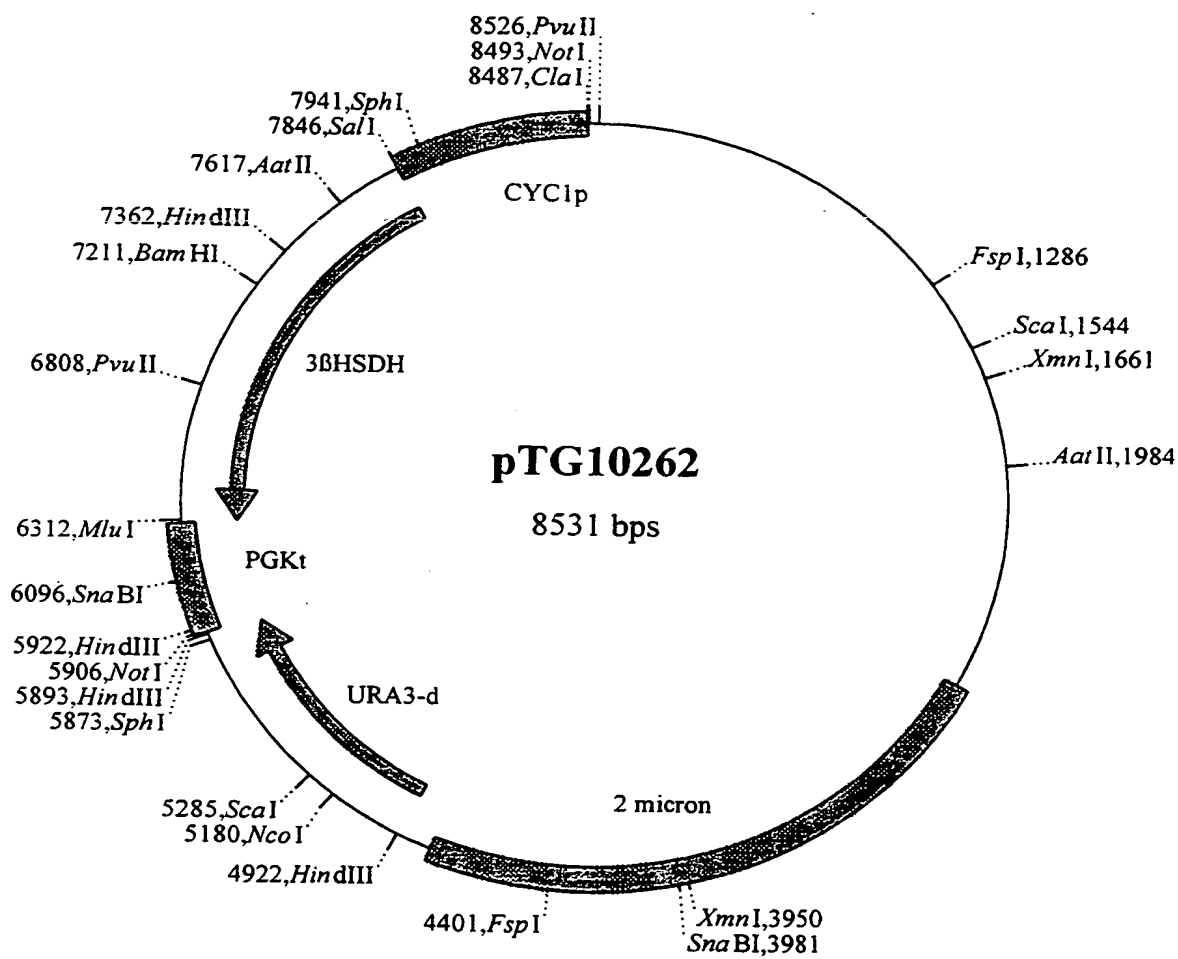


FIGURE 19

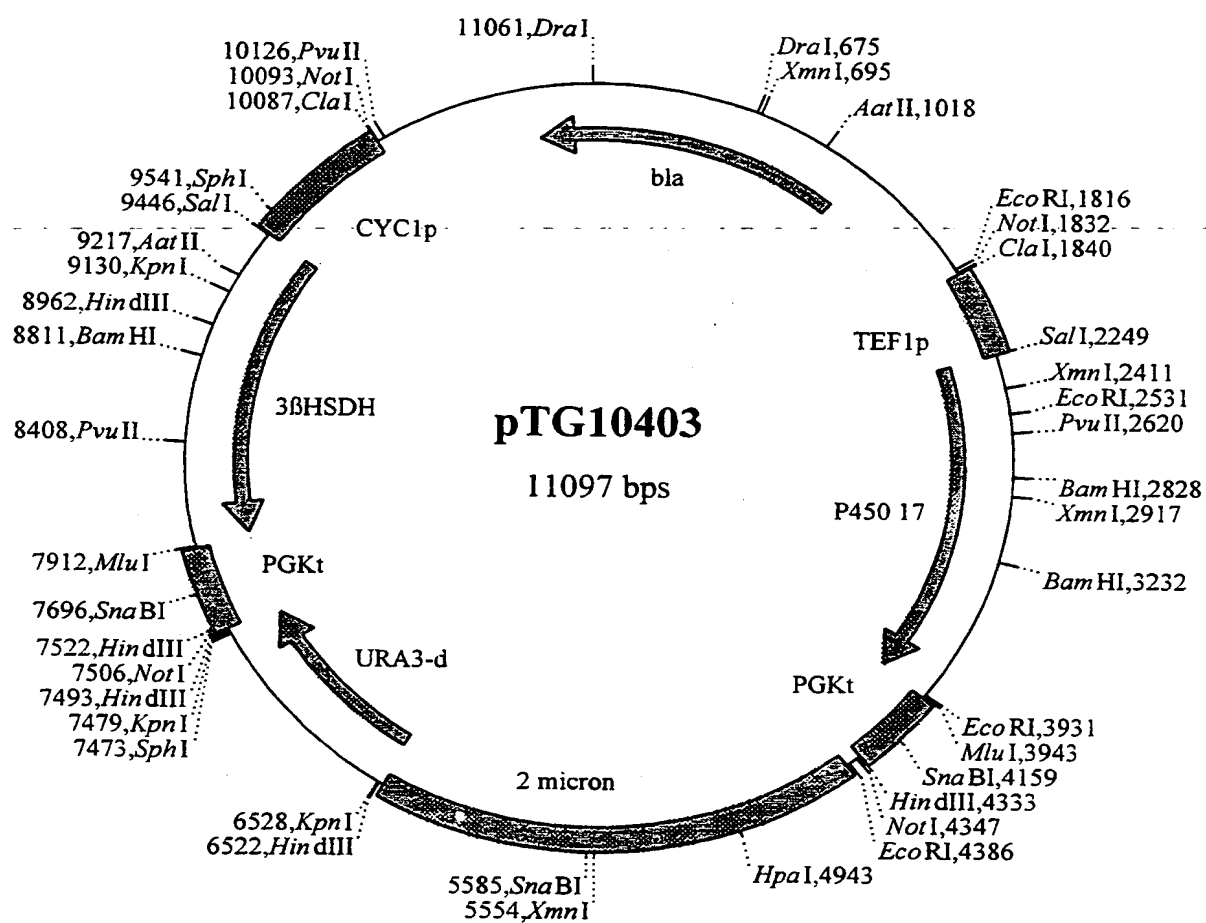


FIGURE 20



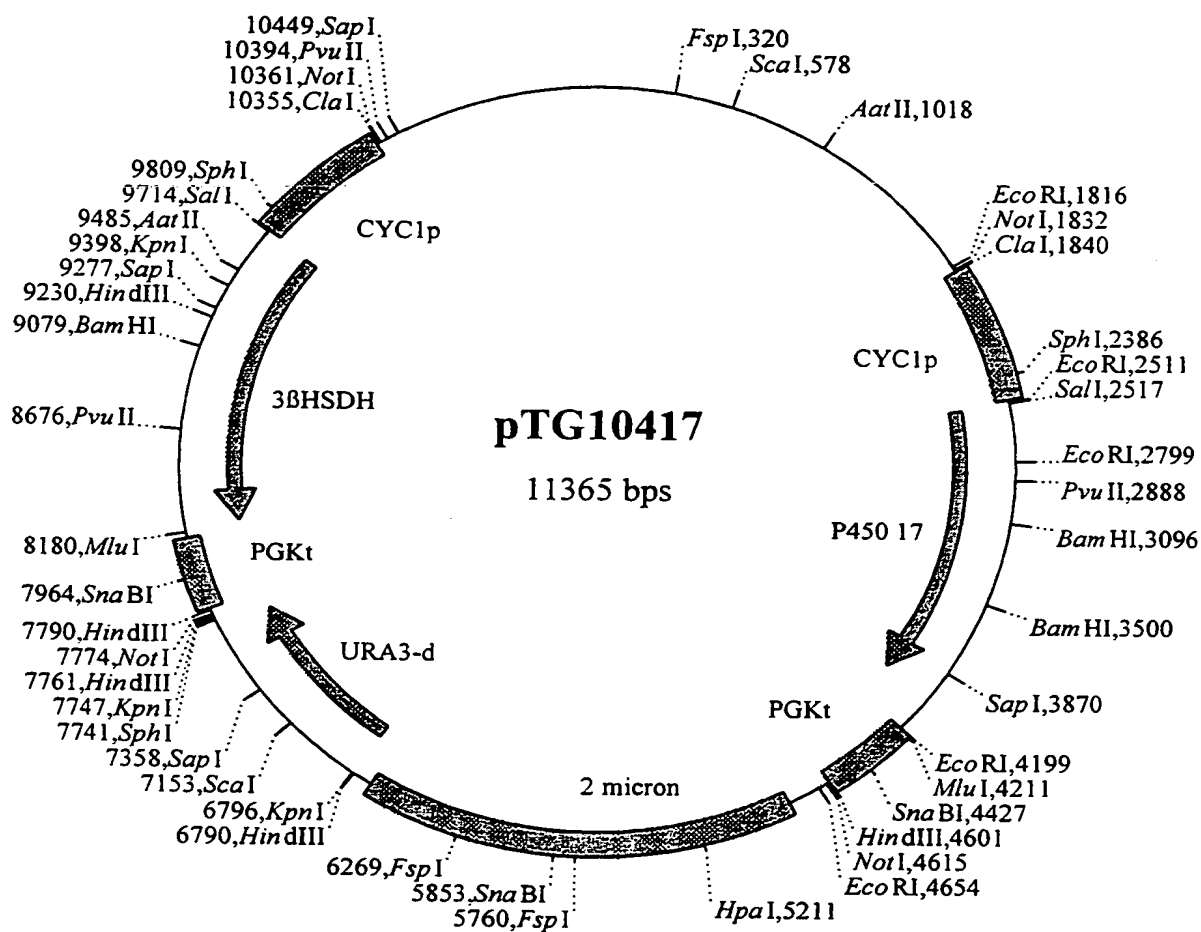


FIGURE 21

1  
LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; Hoechst Marion Roussel

&lt;120&gt; Souches de levure ayant le gène ATF2 interrompu et leurs applications.

&lt;130&gt; 2482 PCT SEQUENCES EN FRANCAIS

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OLIGONUCLEOTIDE

&lt;400&gt; 1

aaaagtcgac aaaatggaag atatagaagg atacgaacca catatcactc

50

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OLIGONUCLEOTIDE

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc feature

&lt;222&gt; Complement((1)..(33))

&lt;400&gt; 2

atcaatctcc aattaggcct cttaggatta ccc

33

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OLIGONUCLEOTIDE

&lt;400&gt; 3

cattcgacat tcccgaaggt gacaatgaca ag

32

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OLIGONUCLEOTIDE

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc feature

&lt;222&gt; Complement((1)..(46))

&lt;400&gt; 4

2

aaaaacgcgt aactattaaa gcgacgcaaa ttcgccgatg gtttgg

46

<210> 5  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 5  
 gggtaatccg aagaggccta attggagatt gataagcttt tcaattcaat tcatcatttt 60  
 ttttttattc ttttttttg 79

<210> 6  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> Complement((1)..(63))

<400> 6  
 cttgtcattg tcaccttcgg gaatgtcgaa tggggtaata actgatataa ttaaattgaa 60  
 etc 63

<210> 7  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 7  
 cacacgcgtg tg 12

<210> 8  
 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 8  
 ctctctgtcg acaaaatgga agatatagaa ggatacgaac cacatatcac tc 52

<210> 9  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> Complement((1)..(33))

<400> 9  
 atcaatctcc aattaggcct cttcgatta ccc 33

<210> 10  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 10  
cattcgacat tcccgaaggt gacaatgaca ag 32

<210> 11  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> Complement((1)..(48))

<400> 11  
aacaacacgc gtaactatta aagcgacgca aattcgccga tgctttgg 48

<210> 12  
<211> 68  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 12  
gggtaatccg aagaggccta attggagatt gatatcgatc acacaccata gtttcaaaat 60  
gtttctac 68

<210> 13  
<211> 67  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> Complement((1)..(67))

<400> 13  
cttgtcattg tcaccttcgg gaatgtcgaa gtttcgaaac gcagaatttt cgagttatta 60  
aacttaa 67

<210> 14  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 14  
gtcgaagctt 10

<210> 15  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 15  
tcgacggacg cgtgg 15

<210> 16  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> Complement((1)..(15))

<400> 16  
tcgaccacgc gtccg 15

<210> 17  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> OLIGONUCLEOTIDE

<400> 17  
cccgaattcg gg 12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/00237

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/54 C12N1/19 C12P33/00 C12N9/10				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12P C12N  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	DUPORT C ET AL: "Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 2, 1 February 1998, pages 186-189, XP002084824 see page 188, column 2, paragraph 1	1-28		
A	EP 0 727 489 A (ROUSSEL UCLAF) 21 August 1996 cited in the application see page 20	1-28		
A	EP 0 340 878 A (GIST BROCADES NV) 8 November 1989 cited in the application see abstract see claims 1-25	10-15		
-/-				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
<b>* Special categories of cited documents :</b> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document but published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search  26 April 1999		Date of mailing of the international search report  10/05/1999		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Lejeune, R		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/00237

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 574 941 A (KIRIN BREWERY) 22 December 1993 see abstract see page 4, line 15 - line 17 ----	1
A	DATABASE EMBL Accession number E12032, 8 October 1997 NAGASAWA S ET AL: "DNA encoding Saccharomyces alcohol acetyltransferase" XP002084826 * 99.3% d'identité sur 1605 paires de bases avec ATF2 * -& DATABASE WPI Section Ch, Week 9648 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 96-479898 XP002084827 & JP 08 242851 A (KIRIN BREWERY KK) , 24 September 1996 see abstract -----	1
A	TAKETANI S ET AL: "Characterization of sterol-ester synthetase in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 575, no. 1, October 1979, pages 148-155, XP002084825 see abstract see table II -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/FR 99/00237

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0727489	A	21-08-1996	FR 2730494 A	14-08-1996
			FR 2734839 A	06-12-1996
			AU 4556796 A	22-08-1996
			BR 9600729 A	23-12-1997
			CA 2169524 A	16-08-1996
			CN 1145953 A	26-03-1997
			CZ 9600432 A	11-12-1996
			FI 960663 A	16-08-1996
			HR 960078 A	28-02-1998
			HU 9600325 A	28-11-1996
			JP 8289793 A	05-11-1996
			PL 312828 A	19-08-1996
			SK 18896 A	01-10-1996
			US 5759801 A	02-06-1998
EP 0340878	A	08-11-1989	AU 635494 B	25-03-1993
			AU 3575989 A	29-11-1989
			CN 1038667 A	10-01-1990
			DK 264890 A	05-11-1990
			IL 90207 A	31-07-1994
			JP 4500303 T	23-01-1992
			WO 8910963 A	16-11-1989
			PT 90484 A, B	30-11-1989
			US 5869283 A	09-02-1999
			AU 638218 B	24-06-1993
			AU 4428289 A	18-04-1990
			CN 1042567 A	30-05-1990
			DK 108790 A	02-05-1990
			EP 0360361 A	28-03-1990
			FI 101551 B	15-07-1998
			IE 71166 B	29-01-1997
			IL 91762 A	30-03-1995
			JP 3501445 T	04-04-1991
			WO 9003428 A	05-04-1990
			PT 92543 A, B	30-03-1990
EP 0574941	A	22-12-1993	JP 6062849 A	08-03-1994
			AU 4131893 A	23-12-1993
			CA 2098696 A	19-12-1993
			US 5521088 A	28-05-1996
			US 5658777 A	19-08-1997
			US 5686284 A	11-11-1997
			US 5728412 A	17-03-1994



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

internationale No  
PCT/FR 99/00237

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/54 C12N1/19 C12P33/00 C12N9/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12P C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DUPORT C ET AL: "Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 16, no. 2, 1 février 1998, pages 186-189, XP002084824 voir page 188, colonne 2, alinéa 1	1-28
A	EP 0 727 489 A (ROUSSEL UCLAF) 21 août 1996 cité dans la demande voir page 20	1-28
A	EP 0 340 878 A (GIST BROCADES NV) 8 novembre 1989 cité dans la demande voir abrégé voir revendications 1-25	10-15
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/05/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde internationale No  
PCT/FR 99/00237

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 574 941 A (KIRIN BREWERY) 22 décembre 1993 voir abrégé voir page 4, ligne 15 - ligne 17 ---	1
A	DATABASE EMBL Accession number E12032, 8 octobre 1997 NAGASAWA S ET AL: "DNA encoding Saccharomyces alcohol acetyltransferase" XP002084826 * 99.3% d'identité sur 1605 paires de bases avec ATF2 * -& DATABASE WPI Section Ch, Week 9648 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 96-479898 XP002084827 & JP 08 242851 A (KIRIN BREWERY KK) , 24 septembre 1996 voir abrégé -----	1
A	TAKETANI S ET AL: "Characterization of sterol-ester synthetase in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 575, no. 1, octobre 1979, pages 148-155, XP002084825 voir abrégé voir tableau II -----	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

L Internationale No

PCT/FR 99/00237

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0727489 A	21-08-1996	FR 2730494 A	14-08-1996
		FR 2734839 A	06-12-1996
		AU 4556796 A	22-08-1996
		BR 9600729 A	23-12-1997
		CA 2169524 A	16-08-1996
		CN 1145953 A	26-03-1997
		CZ 9600432 A	11-12-1996
		FI 960663 A	16-08-1996
		HR 960078 A	28-02-1998
		HU 9600325 A	28-11-1996
		JP 8289793 A	05-11-1996
		PL 312828 A	19-08-1996
		SK 18896 A	01-10-1996
		US 5759801 A	02-06-1998
EP 0340878 A	08-11-1989	AU 635494 B	25-03-1993
		AU 3575989 A	29-11-1989
		CN 1038667 A	10-01-1990
		DK 264890 A	05-11-1990
		IL 90207 A	31-07-1994
		JP 4500303 T	23-01-1992
		WO 8910963 A	16-11-1989
		PT 90484 A,B	30-11-1989
		US 5869283 A	09-02-1999
		AU 638218 B	24-06-1993
		AU 4428289 A	18-04-1990
		CN 1042567 A	30-05-1990
		DK 108790 A	02-05-1990
		EP 0360361 A	28-03-1990
		FI 101551 B	15-07-1998
		IE 71166 B	29-01-1997
		IL 91762 A	30-03-1995
		JP 3501445 T	04-04-1991
EP 0574941 A	22-12-1993	WO 9003428 A	05-04-1990
		PT 92543 A,B	30-03-1990
		JP 6062849 A	08-03-1994
		AU 4131893 A	23-12-1993
		CA 2098696 A	19-12-1993
		US 5521088 A	28-05-1996
		US 5658777 A	19-08-1997
		US 5686284 A	11-11-1997
		US 5728412 A	17-03-1994

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**